

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS (FISIOLOGIA GERAL)

Giovanna Zanetti

Participação da melanopsina na termorregulação de mamíferos

Participation of melanopsin in the thermoregulation of mammals

VERSÃO CORRIGIDA

São Paulo

2023

Giovanna Zanetti

Participação da melanopsina na termorregulação de mamíferos

Participation of melanopsin in the thermoregulation of mammals

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Nathália Moraes

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Zanetti, Giovanna
Participação da melanopsina na termorregulação de mamíferos / Zanetti Giovanna ; orientadora Castrucci Ana Maria de Lauro ; coorientadora Moraes Maria Nathália -- São Paulo, 2023.
74 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Fisiologia).

1. Tecido adiposo marrom. 2. Termorregulação. 3. Genes do relógio. 4. Melanopsina. 5. Peptídeos natriuréticos. I. Castrucci, Ana Maria de Lauro, orient. II. Moraes, Maria Nathália, coorient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228



Assinatura do orientador

Nome: Zanetti, G.

Título: Participação da melanopsina na termorregulação de mamíferos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra Ana Maria de Lauro Castrucci.

Profa Dra Maria Nathália Moraes

Ao meu pai e minha mãe, que sempre falaram sobre o amor.

“Se você tem um sonho, pode transformá-lo em realidade.

Lembre-se que todo meu negócio começou com um sonho e um camundongo.”

Walt Disney

Agradecimentos

Neste espaço abrirei todo meu coração, mas tentarei ser breve, sem esquecer todos que foram fundamentais nessa trajetória. Aqui não escreverei apenas para as pessoas que participaram ativamente nessa fase da minha vida no mestrado, mas também quem partilhou comigo desde o início da minha carreira na biologia e na ciência.

Primeiramente, vir de um núcleo familiar cheio de amor, já é um dos maiores privilégios que a vida me deu. Meu pai, Rodnei, que desde quando eu era criança sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos, o homem mais feminista que já conheci e muito batalhador por ele e pela sua família. Minha mãe, Jonice, o maior exemplo de mulher que tenho, dedicada e focada em tudo o que faz nessa vida. Me criou para que eu pudesse ser dona de mim e que meus sonhos só dependem do quanto eu tiver vontade de realizá-los. “Bora, bora, bora!”.

Agradeço aos meus avôs e avós, por tanto carinho e terem cuidado de mim tão bem, com tanto amor.

Quando entrei no mestrado, minha vida pessoal também havia tido uma grande mudança, era o momento de ser adulta e andar com minhas próprias pernas, mas não sozinha, claro... e sim ao lado do meu companheiro da estrada da vida, Hugo Engler. Agradeço ao universo por ter encontrado um amor e melhor amigo tão nova e estar vivendo intensamente a vida ao seu lado há 10 anos, e ser tão louco quanto eu (esse é o segredo que acho que todo mundo que convive com a gente sabe rsrs). Obrigada por acreditar tanto nos meus sonhos e por fazer parte deles de corpo e alma. “Vamos? Vamos!”.

Por mais que eu seja cética sobre muitos assuntos, eu sempre digo que depois da minha mãe e minhas avós, a vida por acaso, sempre me apresentou mulheres incríveis e inspiradoras!

A minha orientadora professora Ana Maria de Lauro Castrucci, por ter aberto a porta do seu laboratório e seu grupo de pesquisa, quando eu era apenas uma semente nesse mundo científico, no meu primeiro semestre da faculdade. Você me rega todos os dias com conhecimento e ainda sou uma planta em crescimento. Admiro como você impacta a vida de tantas pessoas, como é persistente, determinada e com uma ética admirável pelo que faz. E isso diz também muito sobre o ser humano que é, e acho que isso é o que mais admiro em você. Obrigada por confiar no meu trabalho.

A minha coorientadora Maria Nathalia Moraes, agradeço por tudo o que me ensina desde a iniciação científica, pelas vezes que saiu da Anhembi para ficar comigo no lab de tarde mesmo tendo que voltar porque tinha aulas a noite. Todo esse esforço saiba que foi fundamental para que eu pudesse andar com minhas próprias pernas em muitas técnicas que desenvolvi no mestrado. Te admiro pela sua dedicação e determinação em realizar seus sonhos, obrigada por tanto!

Ao Assis, por toda paciência rsrs, por ter pegado na minha mão na iniciação científica e me ensinado tudo o que podia, para que eu pudesse amadurecer. Ter te reencontrado no congresso de Zurique foi ótimo, obrigada por todas nossas conversas. Te admiro demais. Vamos que vamos!

Sempre conto para todos que sou filha científica desses 3 grandes pesquisadores, rsrs.

A Daniela, agradeço por ter topado em muitas noites encher colchão inflável no lab comigo, você foi fundamental para que os experimentos circadianos acontecessem. Agradeço pela amizade e carinho de sempre.

Ao Neto, um grande parceiro de trabalho. Foi muito bom aprender sobre o mundo dos cavalos marinhos com você, admiro como você é um biólogo apaixonado, que nada e ninguém

te tire isso. Também virou um grande amigo junto de Kass, obrigada pela parceria e o carinho que quero manter para o resto da vida. Vocês dois são incríveis!

A todos os meus colegas do laboratório Thalles, Cris, Miriane, Leticia Menezes, Leticia Marinho, Isa, Glenda e todos que passaram por lá, agradeço pela boa companhia no trabalho, ensinamentos e boas risadas.

A minha terapeuta Nilva Marcandali, por ter me ajudando tanto nessa fase da minha vida no mestrado, que acreditou tanto em mim e no meu potencial quando eu mesma tinha me perdido.

Ao Muay Thai, esporte que me encontrei e me dedico com toda minha força, que me ajudou a ficar tão bem e com saúde e todos os meus parceiros de treino que me ajudam diariamente.

A todos os professores que já passaram pela minha vida, foram vocês que me fizeram chegar até aqui, em especial os do ensino médio da escola Alcina Dantas Feijão, foi lá que descobri o quanto queria ser bióloga e da minha faculdade FMU, que sempre me apoiaram.

A todos meus amigos, que não vou mencionar nome por nome para não ser injusta com ninguém, mas que estão todos no meu coração desde minha adolescência torcendo por mim.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, pelas disciplinas, todos os auxílios, organização de eventos e ótima convivência.

Aos meus colaboradores Dr. Guilherme Gomes da empresa Predikta, a MSc. Ana Flávia e o professor José Cipolla Neto pela disponibilização do seu laboratório.

A FAPESP pelas bolsas de IC (Processo 2018/14286-7) e de mestrado (Processo: 2021/01659-2) e pelos auxílios à pesquisa, CNPq e CAPES pelo auxílio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 <i>Melanopsina, Luz e Temperatura em Mamíferos</i>	17
1.2 <i>Opsinas e Metabolismo Energético</i>	21
1.3 <i>Peptídeos Natriuréticos e Metabolismo</i>	23
2. Hipótese.....	28
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivo específico.....	29
4. Material e Métodos.....	30
4.1 <i>Camundongos</i>	30
4.2 <i>Genotipagem de animais Opn4 KO</i>	30
4.3 <i>Protocolo experimental dos ensaios</i>	31
4.4 <i>Determinação de termoneutralidade</i>	32
4.5 <i>Determinação de consumo circadiano de O₂ e volume de CO₂ expirado</i>	33
4.6 <i>Telemetria de atividade locomotora e temperatura corpórea interna</i>	33
4.7 <i>Termografia</i>	34
4.8 <i>Expressão gênica por qPCR</i>	34
4.9 <i>Extração de RNA total e RT-PCR</i>	34
4.10 <i>qPCR</i>	35
4.11 <i>Quantificação de Proteínas e Western-Blotting</i>	37
4.12 <i>Níveis plasmáticos de ANP e BNP por ELISA</i>	38
4.13 <i>Repositório de dados</i>	38
5. Resultados	39
5.1 <i>Genotipagem de animais Opn4 KO</i>	39
5.2 <i>Determinação de termoneutralidade</i>	39
5.3 <i>Determinação de consumo circadiano de O₂ e volume de CO₂ expirado</i>	40
5.4 <i>Telemetria de atividade locomotora e temperatura corpórea interna</i>	42
5.5 <i>Termografia</i>	46
5.6 <i>Expressão gênica e proteica do marcador do tecido adiposo marrom UCP1</i>	49
5.7 <i>Expressão gênica do controle circadiano do tecido adiposo marrom</i>	51
5.8 <i>Expressão gênica dos receptores de peptídeos natriuréticos no tecido adiposo marrom</i>	53
5.9 <i>Avaliação dos níveis plasmáticos de ANP e BNP</i>	55

6. Discussão	56
7. Conclusões	64
7. Referências Bibliográficas	65

Resumo

As opsinas, proteínas com sete domínios transmembrânicos, são receptores especializados na detecção de luz desde procariotos até o homem. Desfazendo a visão clássica de que opsinas são sensores exclusivos de luz, hoje é aceito que opsinas formam uma família de moléculas multi-funcionais que têm o potencial de perceber temperatura, luz e metabólitos. Em mamíferos, a melanopsina é um fotopigmento retiniano encontrado em um subconjunto de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), que desempenham um papel na sincronização do marcapasso circadiano central em resposta ao ciclo claro-escuro. Em adição à retina, tecidos periféricos expressam melanopsina, sendo o coração o órgão com maior expressão em camundongos. O coração é responsável por produzir e secretar hormônios conhecidos como peptídeos natriuréticos (NPs), os quais apresentam aumento em sua concentração sérica após desafios de frio. É bem estabelecida a influência da temperatura sobre a resposta termogênica em tecido adiposo marrom (BAT): camundongos quando desafiados por baixa temperatura, além da termogênese induzida por ativação de adrenoceptores β_3 no BAT, liberam NPs por ativação de adrenoceptores β_1 cardíacos, fatores natriuréticos esses que também atuam no BAT favorecendo termogênese. Neste trabalho, investigamos se as alterações metabólicas desencadeadas por frio envolvem ativação da melanopsina diretamente no BAT ou uma via indireta que conta com a ativação de melanopsina no coração e consequente regulação da secreção de NPs. E se tais eventos oscilam ao longo do dia. Nossos resultados de consumo de O_2 e no volume de CO_2 expirado demonstraram que em animais *Opn4* KO têm um maior aumento no seu metabolismo do que os WT, de forma a garantir a termorregulação frente ao mesmo desafio de frio. Dados da termografia mostraram que animais *Opn4* KO tiveram uma temperatura maior no BAT e na região inguinal quando comparado com WT a 22°C, o que sugere uma maior produção de calor. Análises de qPCR mostram que transcritos de UCP1 estão marcadamente elevados em ambos os genótipos a 22°C em comparação com a

termoneutralidade e que OPN4 participa da regulação dos genes de relógio *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba* no BAT quando o animal é exposto a diferentes temperaturas. Através de análise de qPCR dos receptores de NPs e secreção de NPs cardíacos, vimos que OPN4 é importante para sua ritmicidade, participando da regulação da termogênese no BAT.

Palavras-chave: Tecido adiposo marrom, termorregulação, genes do relógio, melanopsina, peptídeos natriuréticos.

Abstract

The opsins, proteins with seven transmembrane domains, are receptors specialized in sensing the light from prokaryotes to man. Undoing the view that opsins are exclusively light sensors, today it is accepted that opsins form a family of multi-functional molecules that have the potential to perceive temperature and light. In mammals, melanopsin is a retinal photopigment found in a subset of intrinsically photosensitive ganglion cells (ipRGCs), which play a role in synchronizing the central circadian pacemaker with the day-light cycle. Many peripheral tissues were found to express melanopsin, being the heart the organ with the greatest expression. The heart is responsible for producing and secreting hormones known as natriuretic peptides (NPs), which show increased serum concentration after cold challenges. In addition to the cardiac NP secretion, the influence of temperature on the expression of natriuretic peptide receptors in the brown adipose tissue has been established: mice challenged by low temperature release NPs by the activation of cardiac $\beta 1$ adrenoceptors, NPs favor BAT thermogenesis as does the activation of $\beta 3$ adrenoceptors in BAT. In this work, we investigated whether the metabolic changes triggered by cold involve activation of melanopsin directly in BAT or an indirect pathway that relies on the activation of melanopsin in the heart and consequent regulation of NP secretion. And if such events fluctuate throughout the day. Our results of O_2 consumption and expired CO_2 volume showed that *Opn4* KO animals have a greater increase in their metabolism than WT animals, in order to guarantee thermoregulation facing the same cold challenge. Thermography data showed that *Opn4* KO animals had a higher temperature in the BAT and inguinal region when compared to WT at 22°C, for greater heat production for thermal homeostasis. qPCR analyses showed that UCP1 transcripts are markedly elevated in both genotypes at 22°C compared to thermoneutrality and that OPN4 participates in the regulation of clock genes *Per2*, *Bmal1*, and *Rev-erba* in BAT when the animal was exposed to different temperatures. Through cardiac NP secretion and qPCR analysis of NP receptors, we

demonstrated that OPN4 is important for the NP pathway rhythmicity, participating in the regulation of thermogenesis in BAT.

Keywords: Brown adipose tissue, thermoregulation, clock genes, melanopsin, natriuretic peptides.

1. Introdução

1.1 *Melanopsina, Luz e Temperatura em Mamíferos*

Ao longo da evolução os mais diversos organismos, como cianobactérias, fungos, algas, plantas, invertebrados e vertebrados, desenvolveram mecanismos sensoriais sofisticados de recepção dos ciclos ambientais diários e sazonais para o ajuste de processos comportamentais e bioquímicos (Bell-Pedersen et al., 2005; Hastings et al., 2019). Paralelamente, evoluíram relógios biológicos intrínsecos, que conferem a capacidade adaptativa para se preparar e antecipar esses ciclos ambientais, evidenciada pelos ritmos circadianos (e sazonais) endógenos nos organismos (Pittendrigh et al., 1993; Hastings et al., 2019). A rotação da Terra com ciclos de claro e escuro, radiação luminosa, visível e não-visível, e a temperatura são grandes protagonistas que possibilitam aos organismos ajustes dos osciladores endógenos (Pittendrigh et al., 1993).

Opsinas são as moléculas universais de todos os sistemas visuais dos seres vivos, especializadas em fotorrecepção desde procariotos até o homem. Nos mamíferos, além das clássicas opsinas presentes em cones e bastonetes que participam da via de formação de imagens, há também a presença de melanopsina (OPN4) em uma subpopulação das células ganglionares retinianas, conhecidas como intrinsecamente fotossensíveis (ipRGC). Neurônios retinianos positivos para OPN4 são responsáveis por transmitir as informações luminosas não visuais ao sistema nervoso central (Berson et al., 2002; Provencio et al., 2002; Panda et al., 2003). Esta subpopulação de ipRGCs realiza a transdução do estímulo fótico em elétrico e envia tal informação através da liberação de glutamato nos neurônios hipotalâmicos do núcleo supraquiasmático (NSQ), o marca-passo circadiano central, ajustando-o aos ciclos ambientais (Seabrook et al., 2017). A melanopsina está ligada ao seu cromóforo 11-*cis*-retinal pela base de Schiff e, após a sua foto-estimulação com consequente isomerização do *cis*-retinal em *all-trans* retinal, ocorre a ativação de proteína Gq e fosfolipase C (PLC), abertura de canais de potencial

receptor transitório C (TRPCs), precisamente TRPC6 e TRPC7, por PIP₂ levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio e despolarização (Hughes et al., 2016).

Ao receber informações de pistas ambientais também denominadas *zeitgebers* (ZT, do alemão marcadores de tempo), os componentes moleculares dos NSQs são ajustados a um período de 24 h. O funcionamento do mecanismo molecular do relógio envolve alças de retroalimentação positiva e negativa de transcrição e tradução de inúmeras proteínas (Figura 1). Brevemente em mamíferos os genes *Clock* e *Bmal1* codificam proteínas da alça positiva, as quais formam o heterodímero CLOCK:BMAL1, o qual se liga a promotores que possuem sequências E-box em genes alvos. Mediante essa interação, ocorre a transcrição dos genes *Per 1, 2 e 3* e *Cry 1 e 2*, sendo estes genes e suas respectivas proteínas os componentes da alça negativa (Takahashi et al., 2017). As proteínas PER:CRY formam oligômeros que são direcionados para o núcleo onde inibirão a atividade de CLOCK:BMAL1, regulando negativamente dessa maneira sua própria transcrição. A caseína quinase ϵ fosforila PER:CRY que é degradado, liberando CLOCK:BMAL1 da inibição. Concomitantemente, há um segundo circuito, onde CLOCK:BMAL1 ativa uma outra alça de retroalimentação, dando início à transcrição dos genes *Rev-erb α/β* e *Rora α/β* . As proteínas REV-ERB α/β e ROR α/β competem para se ligar ao elemento responsivo RORE, existente no promotor de *Bmal1*. REV-ERB α/β e ROR α/β apresentam ações antagônicas, inibindo e ativando, respectivamente, a transcrição de *Bmal1* (Preitner et al., 2002; Buhr e Takahashi, 2013). O ciclo de transcrição e tradução descrito acima pode ser observado não apenas no NSQ, mas em todos os tecidos de mamífero estudados até o momento (Stratmann e Schibler, 2006).

A maquinaria do relógio molecular foi inicialmente descoberta em *Drosophila melanogaster*, um modelo experimental muito utilizado há décadas para estudos genéticos. Em 1980, três geneticistas norte-americanos, Jeffrey C. Hall, Michael Rosbah e Michael W. Young, desvendaram o mecanismo por trás do ciclo circadiano, estabelecendo os mecanismos

reguladores da expressão do gene *Per* e de um outro gene denominado *Tim* (*timeless*), responsáveis por regular padrões de respostas que se repetem em um período aproximado de 24 h. Em 2017, os três cientistas foram contemplados com o primeiro Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina para a área da Cronobiologia (Markus, 2017; Guimarães, 2017).

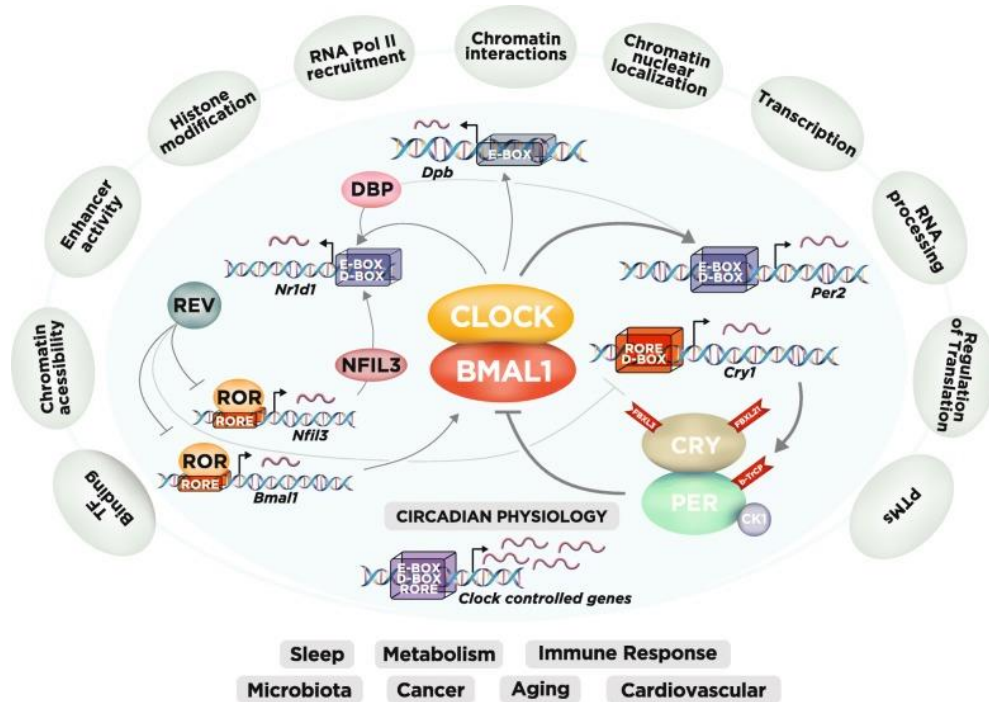


Figura 1. Esquema de genes circadianos e as regulações do genoma em mamíferos. No núcleo, os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 ativam os genes *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2*, cujos produtos proteicos (PER e CRY) reprimem sua própria transcrição. CLOCK e BMAL1 também regulam a expressão dos genes *Nr1d1/2*, que codificam os receptores nucleares REV-ERBa/β. Estes receptores nucleares reprimem a transcrição de *Bmal1* e *Nfil3*, dois genes que são ativados pelo receptor órfão α/β (RORα/β) relacionado ao ácido retinóico. Por sua vez, a proteína NFIL3 juntamente com a proteína de ligação D-box (DBP), bem como CLOCK e BMAL1, regulam o ritmo nos receptores nucleares REV-ERBa/β. Estes três *loops* de *feedback* transcricional interligados regulam a maioria dos genes cíclicos, levando a ritmos em vários sistemas fisiológicos diferentes, desde o sono até o metabolismo e o envelhecimento (parte inferior da figura). Adaptado de Rijo-Ferreira e Takahashi, 2019.

Acreditava-se que a entrada de luz ocorreria exclusivamente pela retina, mas desfazendo essa visão, pesquisadores demonstraram a presença de opsinas em tecidos periféricos que estão submetidos a estímulos de luz e também em órgãos considerados “cegos”. As opsinas podem

ser encontradas em células pigmentares da pele (de Assis et al., 2016), na pele (Sua-Cespedes et al., 2023), vasos sanguíneos (Sikka et al., 2014), artérias pulmonares (Ortiz et al., 2018), pré-adipócitos, tecidos adiposos branco (WAT) e marrom (BAT) (Ondrusova et al., 2017, Sato et al., 2020; Nayak et al., 2020), além de cérebro (Nissila et al., 2012), medula espinhal (Tarttelin et al., 2003) e espermatozoides (Pérez-Cerezales et al., 2015). Em especial, foi evidenciada através de transcriptoma a presença da melanopsina em vários tecidos “cegos” de *Mus musculus*, dentre os quais o coração apresenta a maior expressão deste fotopigmento (ProjetoEncode, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=30044>).

Hoje se sabe que as opsinas têm funções sensoriais independentes da luz, atuando, entre outras, na termorrecepção. Este *insight* foi evidenciado em *Drosophila melanogaster*, cujas larvas apresentaram termo-discriminação quando submetidas a um gradiente térmico (19° a 24°C), sendo que tal característica foi perdida em animais com deleção do gene da rodopsina. Surpreendentemente, a transfecção com a melanopsina murina restaurou essa capacidade (Shen et al., 2011; Sokabe et al., 2016). Posteriormente, foi descrita a presença de opsinas em espermatozoides de camundongos e humanos, cuja orientação para a fecundação baseia-se em termotaxia dependente de OPN2 e OPN4 (Pérez-Cerezales et al., 2015; Roy et al., 2020).

Os ciclos diários de luz e temperatura são talvez as duas pistas de tempo ambiental mais confiáveis para todos os organismos que as utilizam para arrastar seus ritmos circadianos endógenos. Nos dias de hoje, sabe-se que a maioria das células dos mamíferos contém osciladores autônomos que podem usar sinais internos de arrastamento para sincronizar os padrões circadianos de expressão gênica com o resto do corpo. Apesar dos osciladores celulares serem sincronizados pelo NSQ, diversos fatores podem ser implicados na redefinição dos tecidos periféricos (Pittendrigh et al., 1993; Balsalobre, et al., 2000; Brown et al., 2002). A temperatura corporal em mamíferos é geralmente mantida dentro de uma faixa estreita que

apresenta uma variação circadiana com amplitude de 1 a 4°C pela ativação de múltiplas respostas termo-efetoras que estão principalmente sob o controle dos circuitos do sistema nervoso central (Refinetti e Menaker 1992; Madden e Morrison, 2019). Considerando tal característica, Brown e colaboradores (2002) passaram a investigar o papel de ciclos de temperatura sobre a sincronização de genes de relógio em cultura de fibroblastos de ratos. Foi identificado que em ciclo de 37°C/35°C não houve alteração na expressão de genes de relógio, enquanto células submetidas a ciclos de 37°C/33°C e 37°C/27°C apresentaram um aumento na expressão de *Per2*, *Bmal1* e *Cry1*. Sabendo que os ciclos de temperatura são um fator ambiental que exerce efeitos sobre os ritmos biológicos, Buhr e colaboradores (2010) demonstraram através de registros de bioluminescência uma alteração no ritmo de expressão do gene *Per2* no pulmão *ex vivo* de camundongos submetidos a ciclos de temperatura de 38,5°C e 36°C, deixando clara a relação entre termo-estimulação e genes de relógio.

Nosso grupo demonstrou de forma pioneira a relação entre temperatura, melanopsina e genes do relógio. Em linhagens celulares de melanoma (B16- F10) e melanócitos (Melan-a) murinos, o aumento na expressão do gene de relógio *Per1* induzido por pulso de 39,5°C requer a participação da melanopsina (Moraes et al., 2017). Contrariando mais de um século de dogma, de acordo com esses dados, as opsinas formam uma família de moléculas multi-funcionais que têm o potencial de, no mínimo, sentir temperatura e luz (Leung e Montell, 2017).

1.2 Opsinas e Metabolismo Energético

O primeiro trabalho que levantou a relação entre opsinas e alterações metabólicas foi conduzido em 2015 pelo grupo do pesquisador Provencio (Ayturk et al., 2015), o responsável pela descoberta da melanopsina. Camundongos nocautes (KO) para *Opn4* submetidos a dieta cetogênica perderam mais peso do que animais selvagens (WT) ou *rd/rd* (sem cones e bastonetes), quando mantidos em ciclo claro-escuro (fase de luz com comprimento de onda do

azul ou vermelho), ou em escuro constante. Os mecanismos que poderiam explicar tal fato permaneceram em aberto até que, em 2017, iniciou-se um grande interesse da comunidade científica em tentar relacionar opsinas com o metabolismo (Ondrusova et al., 2017; Nayak et al., 2020; Sato et al., 2020; Zhang et al., 2020). Em 2023, nosso grupo demonstrou através de uma análise histológica em pele que camundongos *Opn4* KO possuem uma derme mais espessa e uma camada de tecido adiposo branco hipodérmico mais fina do que animais do tipo selvagem (Sua-Céspedes et al., 2023). Neste cenário, o tecido adiposo branco (WAT) subcutâneo ganhou grande destaque no estudo dos efeitos da luz mediados por opsinas pois constitui um tecido que está em contato próximo com a pele e, portanto, é potencialmente capaz de receber informações sobre as condições de luz ambiental (e possivelmente temperatura). Ondrusova e colaboradores (2017) demonstraram que depósitos subcutâneos de WAT de humanos e cultura de pré-adipócitos de camundongos 3T3-L1 expressam melanopsina. Interessantemente, neste mesmo estudo, foi constatado que a estimulação por luz azul de adipócitos maduros diferenciados a partir de células 3T3-L1 promoveu uma redução no conteúdo lipídico em comparação com o grupo controle mantido em escuro constante.

Além da expressão de OPN4 no tecido adiposo, foi também identificada *Opn3* (Regard et al., 2008). Camundongos *Opn3* KO são propensos a obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta. Ainda, ocorreu uma redução na capacidade termogênica do tecido adiposo marrom (BAT), uma vez que a expressão do RNAm e da proteína de UCP1 (proteína desacopladora 1) encontrava-se drasticamente reduzida em adipócitos de animais nocautes para *Opn3*. De forma contundente foi atribuída função à OPN3 nos mecanismos termogênicos, uma vez que a transfecção de *Opn3* em pré-adipócitos marrons nocautes para esse gene resgatou os níveis de RNAm de *Ucp1*. Embora os genes envolvidos com o acúmulo de lipídios e diferenciação de adipócitos não tenham sido alterados na ausência de OPN3, a cultura celular de adipócitos marrons de animais *Opn3* KO expostos à luz apresentou uma diminuição na

captação de glicose e na respiração mitocondrial em comparação com células selvagens (Sato et al., 2020).

Além das respostas metabólicas mediadas por opsinas após estimulação por luz, foi demonstrado que camundongos *Opn3* KO, expostos a 4°C por 3 h, apresentaram um déficit na capacidade de termogênese e tornaram-se hipotérmicos. Além disso, a luz azul teve um efeito estimulador agudo específico na termogênese, uma vez que aumentou a lipólise de maneira dependente de *Opn3*. Isso sugere que OPN3 participa de respostas funcionais nos tecidos metabólicos (Nayak et al., 2020). Somado a esses resultados, evidências em camundongos mostraram uma via termo-eferente sensível à luz violeta da região pré-óptica hipotalâmica para o BAT e que utiliza OPN5 como o sensor de luz. Atuando como um fotorreceptor cerebral, a OPN5 desempenha um papel inibitório na termogênese do BAT por meio de uma resposta direta à luz que aumenta os níveis intracelulares de AMPc. Camundongos *Opn5* KO mostraram aumentos marcantes na termogênese adaptativa e na atividade do BAT (Zhang et al., 2020). A participação das opsinas, especificamente OPN3 e OPN5, na regulação da termogênese por luz levanta a hipótese interessante de que vias fotorreceptoras não visuais decodificam informações de luz para ajustar a atividade apropriada do BAT (Zhang et al., 2020).

1.3 Peptídeos Natriuréticos e Metabolismo

É bem estabelecido que o coração de mamíferos produz e secreta hormônios conhecidos como peptídeos natriuréticos (NPs): os NPs atriais (ANP), os ventriculares (BNP), e os endoteliais (CNP), a partir de pró-hormônios específicos (de Bold et al., 1981; Nemer et al., 1986; Sudoh et al., 1988).

Atualmente se sabe que os NPs, produzidos pelo coração, estão envolvidos em uma gama de funções biológicas, além de natriurese e diurese, incluindo neurotransmissão e neuromodulação, imunidade, inflamação, diferenciação, lipólise, escurecimento de tecido

adiposo branco e termogênese. Ademais, foi demonstrado que os NPs podem atuar no fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, pâncreas, intestino e sistema nervoso central através de seus receptores, estabelecendo o coração como um importante órgão endócrino (Coué e Moro, 2016).

O BAT pode converter a energia química dos triglicerídeos armazenados em numerosas gotículas lipídicas diretamente em calor quando ativado pelo sistema nervoso simpático em resposta à exposição ao frio. O neurotransmissor norepinefrina irá desencadear uma sinalização por meio do receptor β 3-adrenérgico, que ocorre através via do AMPc e PKA. A PKA fosforila a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) ativando genes termogênicos. PKA ainda fosforila a lipase sensível a hormônios (HSL) levando à liberação de ácidos graxos ácidos (FFA) a partir de triglicerídeos (TG), usados como substrato para termogênese e que atuam como reguladores da atividade de UCP1. Os FFAs liberados podem ativar UCP1 ou serem usados como substrato para oxidação. Este processo tem sido chamado de termogênese induzida pelo frio ou termogênese sem tremores, e resulta de um curto-circuito evocável nas mitocôndrias abundantes do tecido, que é facilitado pelo desacoplamento induzido pela UCP1 - a marca registrada dos adipócitos marrons (Cannon e Nedergaard, 2004; Fenzl e Kiefer, 2014; Straat et al.; 2022).

O ANP e o BNP exercem suas ações biológicas por meio da ligação a um receptor específico guanilil ciclase ligado à membrana, respectivamente receptor tipo A (NPRA) e tipo B (NPRB), desencadeando uma cascata de sinalização no tecido adiposo gerando GMPc que ativa a proteína quinase G, PKG. Esta via funciona em paralelo com a capacidade mais conhecida da norepinefrina (NE) de ativar os receptores β 3-adrenérgicos (β AR3) nesse tecido para aumentar os níveis de AMPc e ativar a proteína quinase A, PKA, como resposta a estresse por frio ambiental (Zois et al., 2014; Gupta e Wang, 2015). Ambas as vias aumentam a

termogênese. Por outro lado, o tipo C (NPRC) é conhecido como receptor de depuração que também se liga aos NPs A e B para removê-los da circulação.

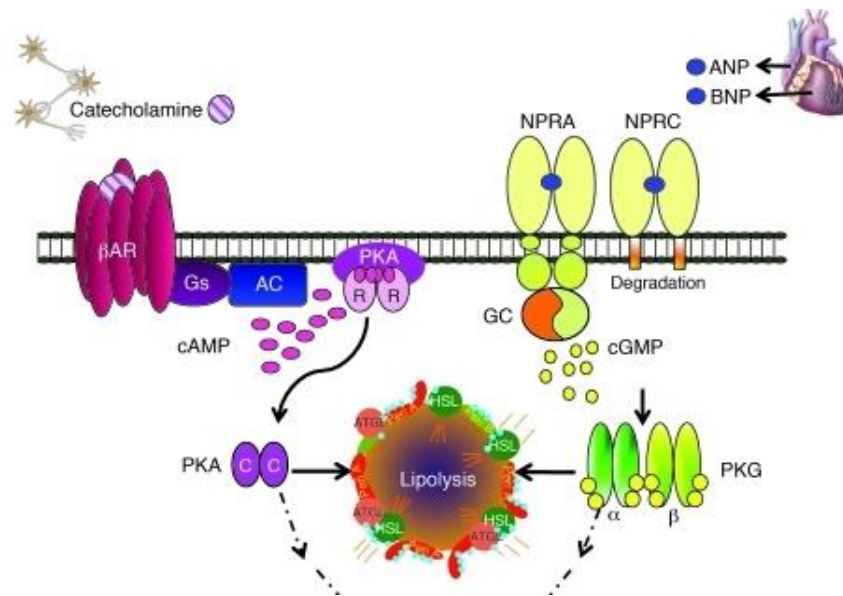


Figura 2. Modelo para ativação paralela de β -AR 3 e NPRAs para estimular a expressão de genes termogênicos no BAT. As catecolaminas ligam-se aos β -ARs nos adipócitos para ativar a proteína Gs e aumentar os níveis de AMPc (ovais rosa). O AMPc liga-se às subunidades reguladoras da PKA. As subunidades catalíticas (C) liberadas (ovais roxas) podem então fosforilar alvos, incluindo lipase hormônio-sensível (HSL) e perilipina (Peri A), para permitir a lipólise dos triglicerídeos armazenados. A lipólise também pode ser ativada por NPs. ANP e BNP ligam-se ao receptor NPRA que é uma guanilil ciclase (GC) para aumentar os níveis de GMPc (círculos amarelos). Os adipócitos também expressam NPRC que remove NPs da circulação. Adaptado de Bordicchia et al., 2012.

Estudos pioneiros demonstraram o papel dos NPs na indução de características de adipócitos marrons em adipócitos brancos humanos e de camundongos, incluindo a capacidade de gasto de energia e termogênese mediada pela UCP1. Em adipócitos marrons de humanos, ANP e BNP ativam o coativador-1 α de PPAR γ (PGC-1 α) e aumentam a expressão de UCP1, responsável por induzir biogênese mitocondrial e a respiração desacoplada respectivamente (Bordicchia et al., 2012).

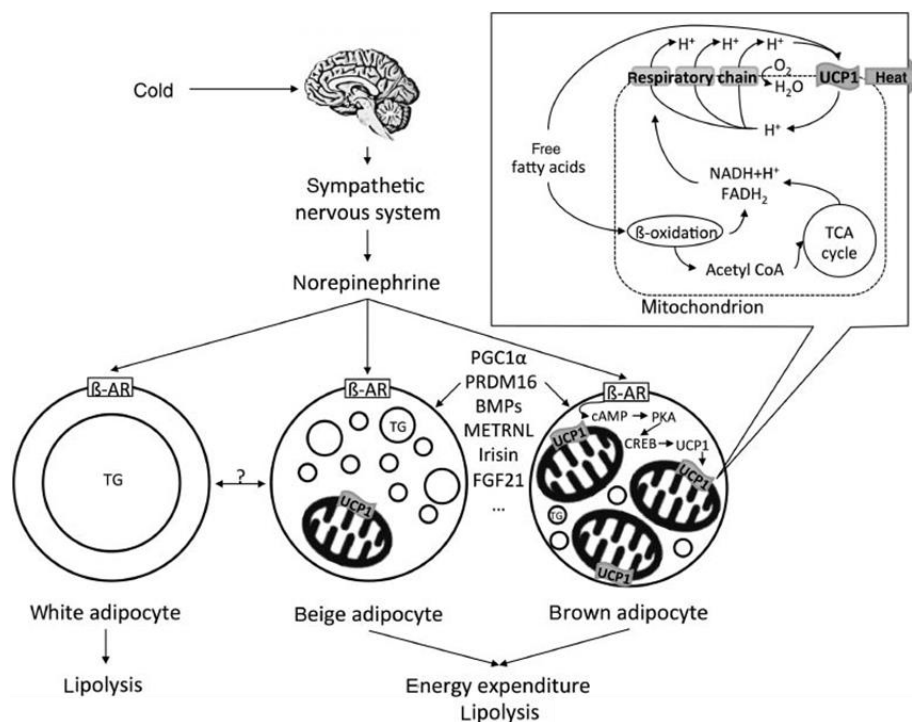


Figura 3. Fisiologia do tecido adiposo marrom. A ativação do sistema nervoso simpático em resposta a frio ambiental resulta na liberação de norepinefrina. A catecolamina liga-se aos receptores β-adrenérgicos (β3-AR) dos adipócitos levando à transcrição da proteína-1 desacopladora do fator termogênico central (UCP1). A UCP1, localizada na mitocôndria, desacopla a respiração da síntese de ATP e, assim, induz a geração de calor (termogênese). Além da ativação simpática estimulada pelo frio, fatores endógenos (por exemplo, PGC1α, PRDM16, proteínas morfogenéticas ósseas, irisina, tipo meteorina e FGF21) desempenham um papel importante na ativação de um fenótipo termogênico. A estimulação β-adrenérgica no tecido adiposo branco resulta principalmente em lipólise e, eventualmente em *browning* para um fenótipo intermediário. Adaptado de Fenzl e Kiefer, 2014.

Em baixas concentrações, agonistas de ANP e de catecolaminas aumentam a expressão de marcadores da gordura marrom e dos marcadores mitocondriais de uma forma dependente de p38 MAPK e mTOR (Bordicchia et al., 2012; Liu et al., 2018). Adicionalmente, camundongos expostos a temperaturas frias ambientais tiveram níveis aumentados de NPs circulantes, bem como maior expressão do receptor de sinalização de NP e menor expressão do receptor de depuração de NP (*Nprc*) em BAT e tecido adiposo branco (WAT) (Bordicchia et al., 2012; Collins et al., 2014; Spanella et al., 2019).

Com esses achados do grupo de Collins e colaboradores (2014), ficou claro que os NPs cardíacos são hormônios cardiometabólicos capazes de ativar a maquinaria característica da termogênese em adipócitos marrons humanos e de camundongos, podendo responder a variações de temperatura para ajustar o metabolismo e manter a temperatura corporal interna.

Nesta vertente, tem sido proposto que as alterações termogênicas induzidas por frio possam ser reguladas também pelo mecanismo molecular do relógio biológico local no BAT. Em camundongos, foi demonstrado que a indução da UCP1 por baixas temperaturas é precedida por uma rápida regulação negativa de *Rev-erba* no BAT. *Rev-erba* reprime *Ucp1* de uma forma autônoma em células adiposas marrons, e os níveis de *Ucp1* são elevados em camundongos KO para *Rev-erba*, mesmo em termoneutralidade. A perda genética de *Rev-erba* também abole os ritmos normais da temperatura corporal e da atividade termogênica do BAT (Gerhart-Hines et al., 2013). Ademais, há vários reguladores importantes do metabolismo que estão sob controle circadiano, como o dímero CLOCK/BMAL1, também responsável por regular outros genes contendo sequências E-box, conhecidos como genes controlados pelo relógio. A família dos PPARs consiste em três isoformas em mamíferos (α , β/δ e γ), um grupo de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição para regular a expressão de uma variedade de genes-alvo, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo energético (Froy e Garaulet, 2018). Entre os membros desta família, PPAR α e PPAR γ são altamente expressos em BAT e são reguladores positivos de genes envolvidos na oxidação de lipídios (*Cpt1*) e termogênese (*Pgc1 α* e *Ucp1*) (Rachid et al., 2015).

2. Hipótese

Sabendo que a melanopsina é sensor multi-funcional, podendo sentir estímulos de luz e temperatura, partimos da premissa de que alterações metabólicas desencadeadas por frio envolvem ativação da melanopsina diretamente no BAT favorecendo a termogênese ou uma via indireta que conta com a ativação de melanopsina no coração e conseqüente regulação da secreção de NPs. Hipotetizamos ainda que, na ausência de OPN4, a expressão de genes de relógio e de componentes da via termogênica apresentam alteração no perfil temporal de expressão.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a participação de OPN4 nas respostas do BAT em camundongos submetidos a frio ambiental crônico (22°C) em comparação com animais mantidos em termoneutralidade, e a participação do relógio local nesse tecido.

3.2 Objetivo específico

Avaliar em animais WT e *Opn4* KO:

1. a faixa de termoneutralidade e a variação circadiana de consumo de O₂, CO₂ expirado e razão de troca respiratória (RER) a 30°C, 22°C e 10°C;
2. a oscilação circadiana da atividade locomotora e temperatura corporal interna em condição de termoneutralidade e em desafio de frio de 22°C;
3. a produção ou perda de calor em condição de termoneutralidade e em desafio de frio de 22°C;
4. a expressão gênica circadiana do marcador metabólico, *Ucp1*, no BAT de animais em termoneutralidade e desafiados por frio;
5. a expressão gênica circadiana dos receptores de NPs no BAT de animais em termoneutralidade e desafiados por frio;
6. a expressão gênica circadiana de *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba* no BAT de animais em termoneutralidade e desafiados por frio;
7. a secreção circadiana de NPs pelo coração de animais em termoneutralidade e desafiados por frio;
8. a expressão proteica na fase de luz e de escuro do marcador metabólico, UCP1, no BAT de animais em termoneutralidade e desafiados por frio.

4. Material e Métodos

4.1 Camundongos. Animais B6;129 (WT) foram resultado de cruzamento de C57BL/6J com 129 obtidos da Jackson Laboratories (EUA); *Opn4* KO em *background* B6;129 foram originalmente adquiridos da Jackson Laboratories (EUA), e as duas linhagens foram mantidas e reproduzidas no biotério do Departamento de Fisiologia (IB-USP).

4.2 Genotipagem de animais *Opn4* KO. Foi realizada a genotipagem da linhagem *Opn4*^{-/-} por meio de amostras de cauda dos camundongos, e sua expansão. A lise do tecido foi feita em 500 uL de uma solução contendo 5 mL de 1 M Tris pH 8; 0.5 mL de 0.5 M EDTA (ambos Sigma, EUA), 5g de SDS (10% p/v) (Merck, EUA), 2 mL de NaCl 5M, (Synth, Brasil), 42,5 mL água *nuclease free*; Tris 1 M, pH 8, EDTA 0,5 M, SDS 10% p/v NaCl 5 M, 10 µL de RNase (20 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (todos da Thermofisher, EUA) a 55°C sob pequena agitação a 700 rpm *overnight*. Para extração do DNA, utilizaram-se 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Thermofisher), sendo a fase superior colocada em novos *ependorfs* que receberam 400 µL de isopropanol (Sigma). As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e lavadas em 200 µL de etanol 75% (Sigma). Após seco, o *pellet* foi ressuspendido em água *nuclease-free* (Thermofisher). A concentração de DNA foi determinada por leitura a OD₂₆₀ e a qualidade pela razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, EUA), sendo aceitos valores > 1.6. A amplificação de DNA em reação em cadeia de polimerase foi feita com 200 ng de DNA total, 25 uL de DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermofisher), 0,25 uL de oligonucleotídeos específicos (IDT, EUA) para a amplificação do alelo *Opn4* WT (0,50 uM) e do cassete presente no animal *Opn4* KO (0,50 uM) (Tabela 1), totalizando 50 uL de reação. As soluções foram colocadas em um termociclador (iCycler, BioRad, EUA) e submetidas às seguintes condições: 94°C por 2 min, 10 ciclos de 94°C por 20 seg, 65°C por 15 seg e 68°C por 10 seg (a cada ciclo

diminuiu-se 0,5°C, protocolo *touchdown*), seguindo 28 ciclos de 94°C por 15 seg, 60°C por 15 seg e 72°C por 10 seg e extensão final a 72°C por 2 min (protocolo recomendado por Jackson Laboratories, EUA). Uma vez terminada a reação, alíquotas foram utilizadas para caracterização em gel de agarose 1,2% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Thermofisher), contendo 10 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, EUA). As amostras foram submetidas a eletroforese a 130V durante 30 a 40 min. As imagens das bandas foram obtidas em fotodocumentador (Gel-Pro Imager, The Integrated Solution, EUA).

Tabela 1. Primers para *Opn4^{tm1.1Yau/J}*

18425 AGG CTG GAT GGA TGA GAG C	Forward
18426 GTT GTG AAG CTG GGA TCC TG	Wild type reverse
18427 GGT CTT CCA GGT TGG ATG TG	Mutant reverse

4.3 Protocolo experimental dos ensaios. Foram utilizados camundongos machos de genótipos B6;129 (WT) e *Opn4* KO com idade de 3 a 4 meses, conforme estabelecido em protocolo CEUA 350/2019, Instituto de Biociências, USP. O número de animais utilizados por experimento foi de 2-3 com uma repetição independente totalizando 6 animais por protocolo. Os animais foram aclimatados por duas semanas em temperatura termoneutra (30°C) a qual foi determinada por calorimetria indireta, conforme protocolo abaixo e baseado na literatura (Tsoli et al., 2012; Clayton e McCurdy, 2018). O regime de fotoperíodo foi claro/escuro LD 12:12, com intensidade de 800 lux (lâmpadas LED), luz acesa às 7 h e apagada às 19 h. Após a aclimação, os animais dos 2 genótipos foram individualizados com alimentação e água *ad libitum* e separados em 2 grupos no dia 0: 1) grupo controle mantido a 30°C por 2 semanas; 2) grupo desafiado a 22°C por 2 semanas. Após esse período, os animais dos grupos 1 e 2 foram eutanasiados a cada 4 horas, ao longo de 24 h: período de claro ZT2, ZT6 e ZT10; período de escuro ZT14, ZT18 e ZT22 (Figura 4). Em todos os grupos foi feita a coleta de sangue do qual

se obteve o plasma por centrifugação e do BAT, que foram armazenados em -80°C, até o processamento das amostras.

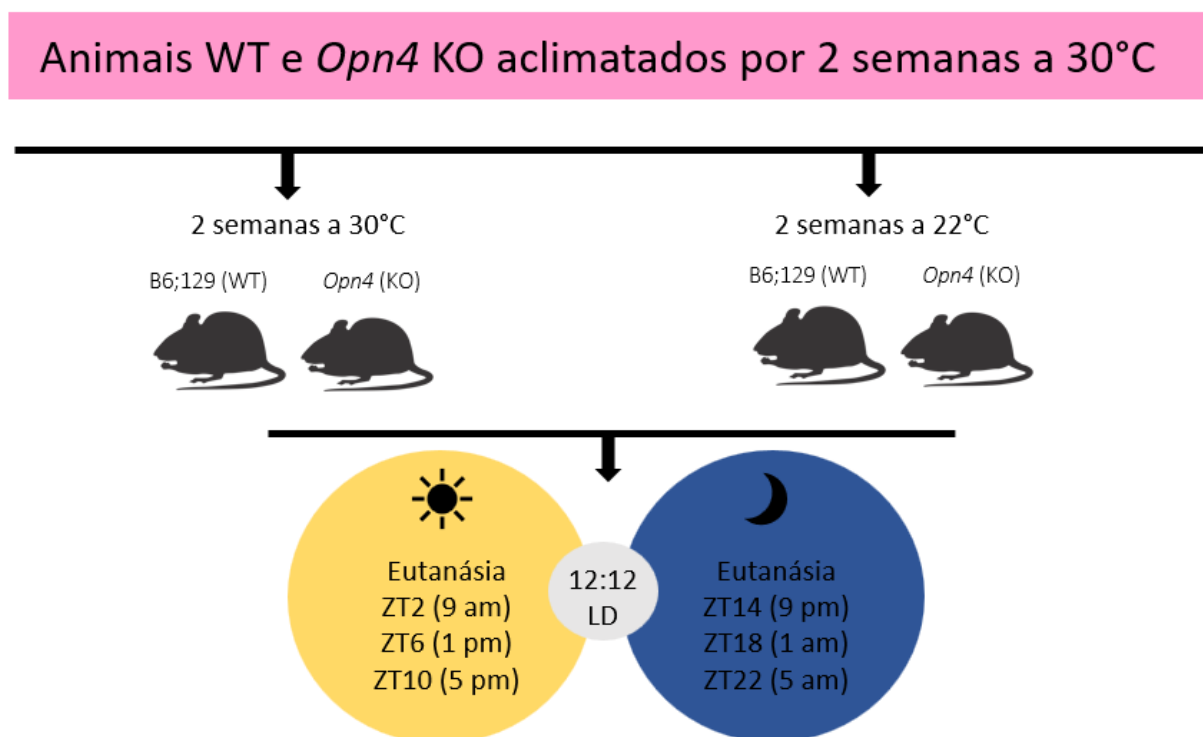


Figura 4. Protocolo experimental. Animais WT e *Opn4* KO, previamente adaptados a temperatura termoneutra (30°C) por 2 semanas, foram individualizados e submetidos a 22°C por 2 semanas. Os animais dos 2 grupos (temperaturas de 30°C e 22°C) foram eutanasiados de 4 em 4 horas. O regime de fotoperíodo foi de 12:12 LD (luz acesa às 7 h).

4.4 Determinação de termoneutralidade. O ensaio de termoneutralidade foi realizado no laboratório de Neuroimunologia da Sepse do Prof. Dr. Alexandre A. Steiner, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por meio de um sistema completo de monitoramento de animais de laboratório (Comprehensive Lab Animal Monitoring System; CLAMS, Columbus Instruments, EUA). Após um período de adaptação de 24 h em caixas metabólicas, os volumes de consumo de oxigênio e de CO₂ expirado foram medidos a temperaturas de 16 a 36°C, com intervalos de 2,5 graus, por períodos de 2 h 30 min durante a fotofase por 3 dias consecutivos. As leituras de oxigênio foram convertidas para taxa metabólica

(TM), de acordo com a seguinte equação: $TM [mL O_2 / h] = \Delta vol\% O_2, \text{ fluxo } [L / h]$. Os pesos eram diferentes ($p= 0,0321$) entre animais WT (28,5 g) e *Opn4* KO (25,5 g). A taxa de fluxo foi ajustada para 14 ~ 35 L/h. Para ajustar as diferenças nas taxas de fluxo do ar na saída e entrada nas gaiolas metabólicas, a razão de troca respiratória (RER) (volume de CO₂ produzido/volume de O₂ consumido) foi usada.

4.5 Determinação de consumo circadiano de O₂ e volume de CO₂ expirado. O próximo passo deste projeto foi avaliar o metabolismo dos animais *Opn4* KO através da medida de consumo circadiano de O₂ frente a diferentes temperaturas. Assim como o ensaio de termoneutralidade, o monitoramento foi realizado pelo equipamento CLAMS. Após um período de 4 a 6 h de aclimação à câmara de respirometria em temperatura ambiente, os animais foram registrados por 36 horas em temperaturas ambientes fixas (termoneutra, 22°C e 10°C), em ciclo claro-escuro de 12:12 h, com luzes ligando às 7 h. A análise e cálculos foram os mesmos citados acima.

4.6 Telemetria de atividade locomotora e temperatura corpórea interna. Os animais foram anestesiados por cetamina (80 mg/kg animal) e xilazina (15 mg/kg animal) e, após implantação intraperitoneal de sensores, os animais foram alojados individualmente e acompanhados por 4 semanas para registro de atividade locomotora e da temperatura corpórea interna, sob regime de fotoperíodo claro/escuro LD 12:12 (intensidade 800 lux, lâmpadas de LED e *lights on* 7 h e *off* 19 h), sendo as duas primeiras semanas em termoneutralidade seguidas por 2 semanas a 22°C.

A temperatura interna e a atividade locomotora dos camundongos machos genótipos B6;129 (WT) e *Opn4* KO, sob temperatura termoneutra de 30°C e em desafio de frio a 22°C, foram monitoradas e registradas continuamente em intervalos de 1 minuto após implantação

prévia (5 dias antes) dos sensores de telemetria (E-Mitter Telemetry Implants, Starr Life Sciences, EUA), utilizando o programa de processamento e armazenamento de dados, VitalView (VitalView ® Data Acquisition System, Software version 4.0).

4.7 Termografia. A análise da temperatura corpórea por imagem termográfica foi realizada em colaboração com o Dr. Guilherme Gomes (Predikta, Brasil). Foram feitas imagens em animais WT e *Opn4* KO ao final da segunda semana em termoneutralidade 30°C, e ao final da segunda semana a 22°C dos animais que estavam em telemetria entre o ZT1 e ZT2. As imagens térmicas foram obtidas com uma câmera infravermelha SC640 (detector 640 × 480 px, sensitivity: <30 mK, IR: 7,5–13 µm, Flir Systems, EUA) e a média da temperatura superficial das diferentes partes do corpo foi analisada pelo programa Thermacam 2.9 (Flir Systems), linguagem Python e ImageJ (emissividade 0,98). Área (1x1cm) de emissividade e temperatura conhecidas obtidas por pares térmicos (4-canais data logger - modelo: RDXL4SD Omega), foram usadas como a referência no *background* da imagem (fora do corpo do animal). As temperaturas médias do depósito de BAT interscapular, do tecido adiposo subcutâneo e cauda foram obtidas por medidas de áreas em cada região anatômica. Não houve anestesia.

4.8 Expressão gênica por qPCR. Foi avaliada a expressão gênica no BAT dos genes de relógio *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba*, dos receptores de NPs *Npra*, *Nprb*, *Nprc*, e do marcador da via termogênica *Ucp1*. O gene *Rpl37a* foi usado como normalizador.

4.9 Extração de RNA total e RT-PCR. Os órgãos foram homogeneizados em 300 µL de Trizol, usando um homogeneizador refrigerado Bead Blaster (Benchmark Scientific, EUA) a 4°C a uma velocidade de 3650 rpm com 1 corrida de três ciclos, com 30 s de intervalo. Após completar o volume para 1 mL de TRizol, a amostra foi centrifugada (1.500 x g, 10 min). Para

extrair RNA total, o sobrenadante (500 μL) foi transferido para outro *ependorf* recebendo 200 μL de 1-bromo-3-cloropropano (Sigma-Aldrich, EUA) seguido de agitação vigorosa (vórtex) por 15 s e centrifugação (12.000 x g a 4°C, 15 min). A seguir, 400 μL da fase aquosa superior foram transferidos para outro *ependorf*, recebendo 600 μL de isopropanol (Sigma-Aldrich, USA) e descanso de 10 min à temperatura ambiente. Após centrifugação (12.000 x g a 4°C, 35 min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 75% (1X). Após centrifugação (12.000 x g a 4°C, 15 min), o sobrenadante foi descartado e o RNA ressuspendido em 20 μL de H₂O DEPC. A concentração de RNA foi determinada por leitura a OD₂₆₀ e a qualidade pela razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, EUA).

A integridade do RNA foi verificada colocando-se 1 μg de cada amostra em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio em tampão TAE, e eletroforese a 100 V. A reação de RT-PCR foi realizada com a enzima *Superscript III* usando-se primers hexâmeros randômicos (ThermoFisher, EUA) e outros reagentes conforme instruções do fabricante e o cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo.

4.10 qPCR. As reações continham 12,5 ng μg de cDNA, 300 nM de cada primer (gene de interesse ou *Rpl37a*) e PowerUp SYBR® Green qPCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, EUA). As soluções foram então distribuídas nos poços da placa experimental (6 μL /poço). Os ensaios foram realizados em um termociclador QuantStudio 6 Applied Biosystem (ThermoFisher, EUA) nas seguintes condições: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido por 50 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C e a *melting curve* 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min seguido por aumento gradual de 0,05°C até atingir 95°C. Os resultados de PCR quantitativo foram obtidos pelo método do $\Delta\Delta C_T$ (Livak e Schmittgen, 2001). O valor de CT é o número de ciclos obtido passando-se uma reta denominada limiar que cruza as porções de crescimento

geométrico das curvas de amplificação. Sabendo-se CT , é encontrado ΔC_T que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor para o *Rpl37a* da mesma amostra de cDNA. A seguir, obtém-se o $\Delta\Delta C_T$ subtraindo o menor valor médio do grupo controle de temperatura termoneutra de WT dos valores encontrados para cada valor experimental de cada genótipo, sendo elevado negativamente na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) e esse valor foi utilizado nas análises estatísticas. Os pares de *primers* específicos para cada gene utilizados nos protocolos abaixo (Tabela 2) foram baseados nas sequências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), abrangendo introns, desenhados pelo programa *Primer Blast* e sintetizados pela IDT (IDT, EUA). As possíveis diferenças entre os animais controles (termoneutralidade) e aqueles estimulados por diminuição de temperatura, e entre os 2 genótipos à mesma temperatura e entre os pontos coletados (ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18 e ZT22) foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (Graphpad 7.0).

TABELA 2. Sequências de primers (números de acesso entre parênteses)

<i>Per2</i> (NM_011066)	Forward: 5'-TTCCTACAGCATGGAGCAGGTTGAT-3' Reverse: 5'-ATGAGGAGCCAGGAACTCCACAAA-3'
<i>Bmal1</i> (NM_001243048)	Forward: 5'-AAGCTTCTGCACAATCCACAGCAC-3' Reverse: 5'-TGTCTGGCTCATTGTCTTCGTCCA-3'
<i>Rev-erba</i> (NM_145434.4)	Forward: 5'-AAGACATGACGACCCTGGAC-3' Reverse: 5'-CCATGCCATTCAGCTTGGTAAT-3'
<i>Ucp1</i> (NM_009463.3)	Forward: 5'-CAGCTTGCCTGGCAGATATCA-3' Reverse: 5'-TTGGATCTGAAGGCGGACTT-3'
<i>Npra</i> (NM_008727.5)	Forward: 5'-CCACTTTTCCACACTGGAGGT-3' Reverse: 5'-AGCAGGGAGCCATAATTGGAG-3'
<i>Nprb</i> (NM_173788.4)	Forward: 5'-CGGGAGTCACCTTCATCATGT-3' Reverse: 5'-TGTCATGAGCGAGCCGTAA-3'

<i>Nprc</i> (NM_008728.2)	Forward: 5'-GATGCTCGCTCTGTTTCGC-3' Reverse: 5'-GTCACCACTGGCACACATGA-3'
<i>Rpl37a</i> (NM_009084.4)	Forward: 5'-CGGCGACATGGCTAAACG-3' Reverse: 5'-ACGGCTCGTCTCTTCATCTTG-3'

4.11 Quantificação de Proteínas e Western-Blotting. A proteína foi extraída de metade do BAT em 600 uL de Pierce™ RIPA Buffer pH 7,6 (Thermo Scientific, EUA) adicionando-se coquetel inibidor de protease sem EDTA (cOmplete™, Mini, Roche, Alemanha) e de fosfatase (PhosStop, Roche, Alemanha), usando-se um homogeneizador refrigerado *Bead Blaster* (Benchmark Scientific, EUA) a 4°C a uma velocidade de 3650 rpm com 1 corrida de três ciclos, com 30 s de intervalo. O teor de proteína foi determinado por Pierce BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, EUA) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, e a absorbância medida a 562 nm no leitor de ELISA. O extrato foi colocado em tampão Laemmli 2x (Bio-Rad, EUA) e 50 mM de DTT (ditiotreitól) (Bio-Rad, EUA, EUA) e aquecido a 90°C por 5 min. Um total de 20 ug de proteína foi pipetada por poço de mini gel SDS-PAGE (10%) e transferidos para membranas de PVDF/Filter Paper Sandwiches, 0.45 µm, 8.3 x 7.3 cm (Invitrogen, Canadá). Após transferência, foi feito o bloqueio com 5% de albumina (Roche, Alemanha) por 1 h, seguido de incubação *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-GAPDH feito em coelho (Cell Signaling, EUA) diluído 1:1.000 em 5% albumina. As membranas foram lavadas por 5 min com TBS-Tween 1x (Novex™ Thermo Scientific, EUA) (3X), seguido de incubação com anticorpo secundário anti-coelho IgG-HRP 1:5.000 (Santa Cruz Biotechnology's, EUA) por 2 h e depois lavadas com TBS-Tween 1x. As bandas positivas para GAPDH foram visualizadas com Amersham™ Imager 600 (GE Life Sciences, Inglaterra). Em seguida, as membranas foram incubadas e lavadas conforme protocolo *Mild stripping* (Stripping for reprobing, Abcam, EUA), e foi feito novamente o bloqueio com 5% de albumina por 1 h, seguindo-se incubação *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-UCP1 feito em

coelho (Cell Signaling, EUA) diluído 1:1.000 em 5% albumina. As membranas foram lavadas (3X) por 5 min com TBS-Tween 1x, seguido de incubação com anticorpo anti-coelho IgG-HRP 1:12.000 por 2 h e depois lavadas com TBS-Tween 1x. As bandas positivas para UCP1 foram visualizadas com Amersham™ Imager 600 (GE Life Sciences, Inglaterra). As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ e comparadas através de *Two-way* ANOVA seguido por Bonferroni para verificação da influência do fator temperatura, genótipo e tempo. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$ (GraphPad 7.0).

4.12 Níveis plasmáticos de ANP e BNP por ELISA. Foram utilizados plasmas de camundongos WT e *Opn4* KO expostos a diferentes temperaturas nos ZT2 e ZT14 para quantificação de níveis de ANP e BNP. O sangue foi coletado em tubos de 1,5 mL, em seguida centrifugado a 1.000 x g a 4°C por 10 min. Os procedimentos de quantificação de ANP e BNP seguiram os protocolos do fabricante (RayBio ® Mouse / Rat Brain Natriuretic Peptide EIA Kit, EUA). Ao final a placa foi levada ao leitor de ELISA e a absorbância medida a 450 nm. Os níveis de ANP e BNP plasmáticos de animais dos grupos controle e experimentais (submetidos as temperaturas 30°C e 22°) foram comparados através de *Two-way* ANOVA seguido por Bonferroni para verificação da influência do fator temperatura, genótipo e tempo. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0.05$ (GraphPad 7.0).

4.13 Repositório de dados. Os dados foram armazenados em nuvem <https://figshare.com/account/home#/projects/177777>. Todo esse material foi armazenado e atualizado em sistema de compartilhamento em nuvem, ficando disponível aos colaboradores, instituição sede e financiadora. Os dados também serão disponibilizados ao público a partir da publicação dos artigos de referência a esses dados através deste repositório.

5. Resultados

5.1 Genotipagem de animais *Opn4* KO.

O primeiro objetivo desse projeto foi a expansão da linhagem *Opn4* KO originalmente adquirida da empresa Jackson Laboratory. Realizamos genotipagem dos animais *Opn4* KO por meio de amostras de cauda dos camundongos.

Os nossos resultados com camundongos machos e fêmeas mostram uma banda em 490 pb para animais *Opn4* KO e duas bandas, de 187 e 490, para heterozigotos (Figura 5).

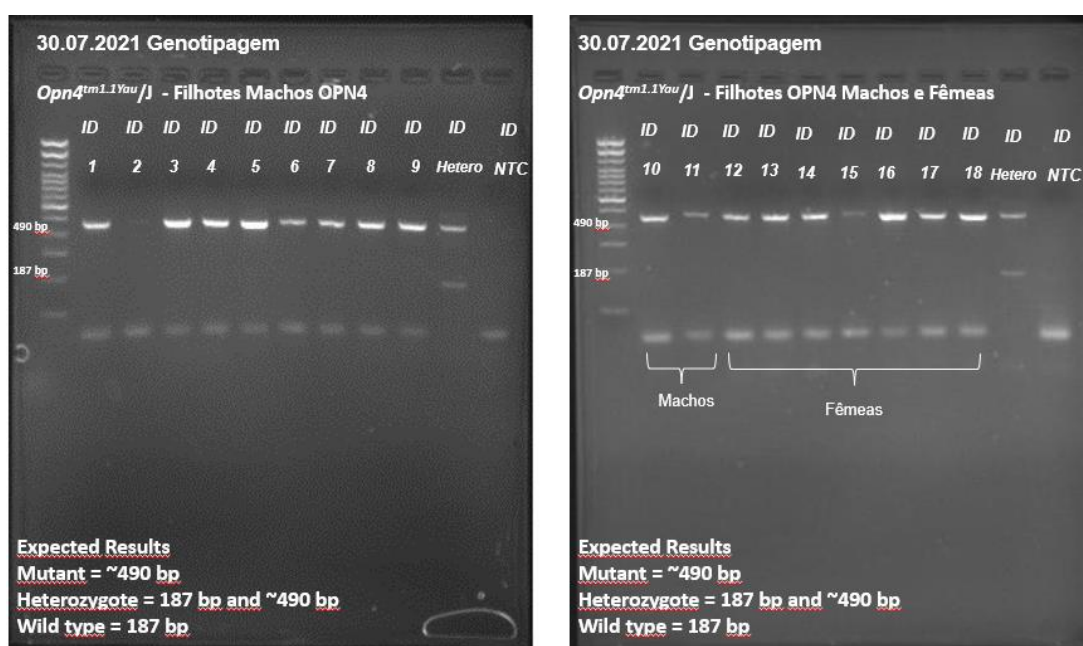


Figura 5. Gel de agarose mostrando os genótipos *Opn4* mutante (KO) e heterozigoto.

5.2 Determinação de termoneutralidade.

Já é estabelecido que a manutenção da temperatura corporal requer atividades bioquímicas significativas, as quais dependem da temperatura ambiente. A maioria dos estudos com camundongos de laboratório é realizada em temperaturas abaixo de sua zona termoneutra. A zona termoneutra é caracterizada como a faixa de temperatura ambiente na qual a taxa metabólica e a produção de calor são mínimas, podendo ser mantida pelo metabolismo basal do animal (Hylander e Repasky, 2016). Como o objetivo principal deste projeto envolve a

participação da melanopsina na resposta ao frio ambiental, realizamos um ensaio para determinação da zona termoneutra em animais das linhagens *Opn4* KO e B6;129 (WT).

Observa-se na Figura 6 (A, B e C), que a faixa de termoneutralidade dos animais WT encontra-se entre 26 e 36°C (Figura 6A, B) e para *Opn4* KO entre 23,5 e 36°C (Figura 6A, C). Dessa forma estabelecemos 30°C como temperatura termoneutra e como desafio de frio 10 ou 22°C para ambas as linhagens.

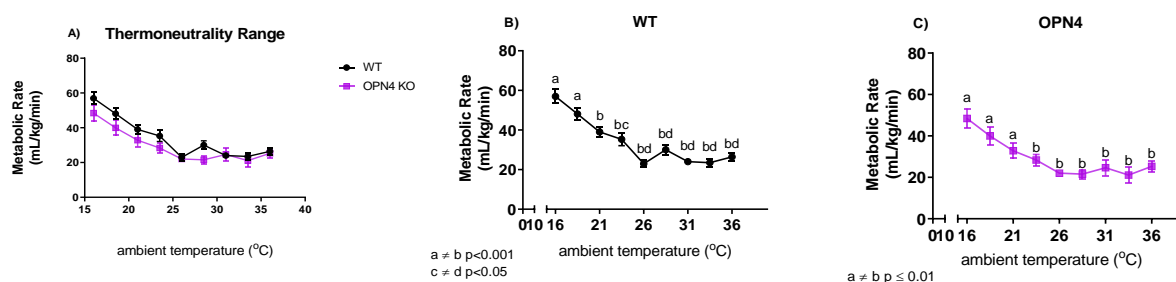


Figura 6. Termoneutralidade de animais WT e *Opn4* KO (n= 4). (A) Comparação entre os animais WT e *Opn4* KO, (B) WT e (C) *Opn4* KO. As diferenças entre as respostas às temperaturas em cada genótipo foram analisadas por *One Way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5.3 Determinação de consumo circadiano de O_2 e volume de CO_2 expirado

O próximo passo deste projeto foi avaliar o metabolismo dos animais *Opn4* KO através da medida de consumo circadiano de O_2 e volume de CO_2 expirado frente a diferentes temperaturas.

As variações circadianas do consumo de O_2 e do volume expirado de CO_2 na temperatura de 30°C em ambos os genótipos foram idênticas (Figura 7A, 8A). Observa-se um claro aumento no consumo de O_2 e no volume de CO_2 expirado nos animais *Opn4* KO em relação aos animais WT quando mantidos em 22°C. Análise estatística apontou diferença significativa nos 2 parâmetros entre animais WT e *Opn4* KO em 22°C em todos os horários (Figura 7B, 8B). Na temperatura de 10°C, também houve diferença significativa entre animais

WT e *Opn4* KO em todos os horários (Figura 7C, 8C). A razão de troca respiratória (RER) corresponde a relação entre o CO₂ produzido e o O₂ consumido pelo cálculo da razão VCO₂/VO₂, demonstrando a contribuição dos carboidratos e lipídios no metabolismo energético, pois esses substratos diferem quanto à quantidade de O₂ utilizado e de CO₂ produzido durante a oxidação. Dessa forma, os valores de RER vão de 0,70, em que o substrato utilizado seriam os lipídios, a 1 em que o substrato seriam os carboidratos. RER não foi significativamente alterada entre os animais WT e *Opn4* KO ao longo dos experimentos submetidos a diferentes temperaturas, demonstrando RER <1, podendo sugerir que a ausência da *Opn4* não altera a preferência da utilização do substrato. O aumento no consumo de O₂ e no volume expirado de CO₂ identificado nos animais *Opn4* KO ocorreu em sua maior magnitude na fase de escuro, momento no qual os animais concentram sua atividade. É importante mencionar que havia diferenças entre os pesos dos animais antes ou durante o ensaio (p= 0,0321; WT 28,5 g e *Opn4* KO 25,5 g). De posse desses resultados passamos a avaliar a atividade locomotora e temperatura corporal interna nos animais *Opn4* KO.

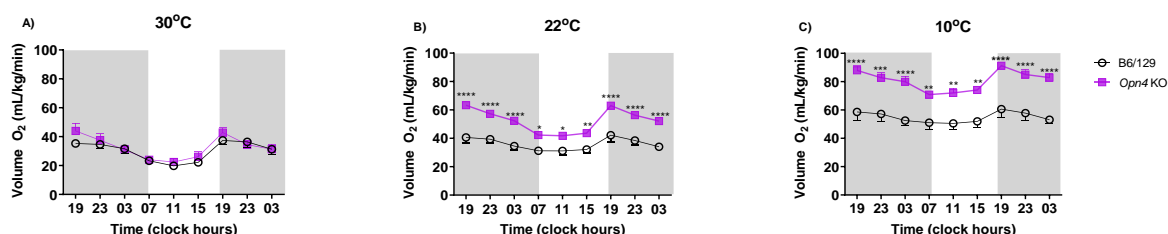


Figura 7. Consumo circadiano de O₂ em animais WT e *Opn4* KO. (A) 30°C, (B) 22°C e (C) 10°C. Os dados foram plotados como a média do consumo de oxigênio ± EPM (n=4). Área sombreada (A-C) = fase de escuro. As diferenças entre os genótipos foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. ****p<0,0001; * p = 0,0109 ou * p = 0,0164; ** p =0,0074 a 22°C; ****p<0,0001; ***p = 0,0002; **p = 0,0073 ou **p = 0,0029 ou **p = 0,0019 a 10°C.

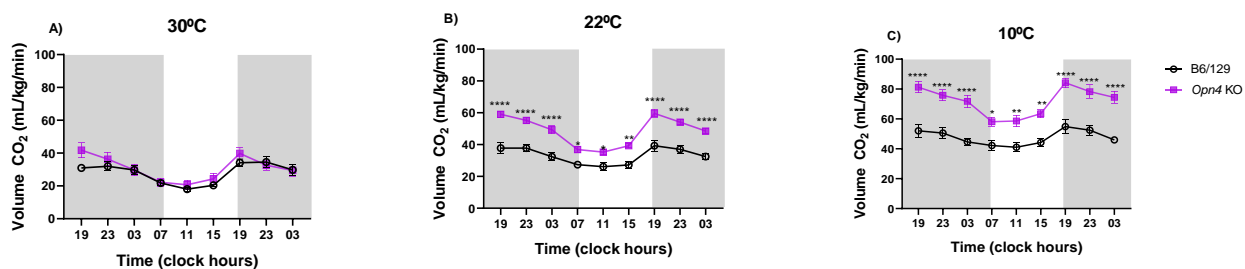


Figura 8. Volume de CO₂ expirado em animais WT e *Opn4* KO. (A) 30°C, (B) 22°C e (C) 10°C. Os dados foram plotados como a média do volume expirado \pm EPM (n=4). Área sombreada (A-C) = fase de escuro. As diferenças entre os genótipos foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. ****p<0,0001; *p = 0,0318 ou *p = 0,0411; **p = 0,0024 a 22°C; ****p<0,0001; ** p = 0,0075 ou ** p = 0,0025; *p = 0,0208 a 10°C.

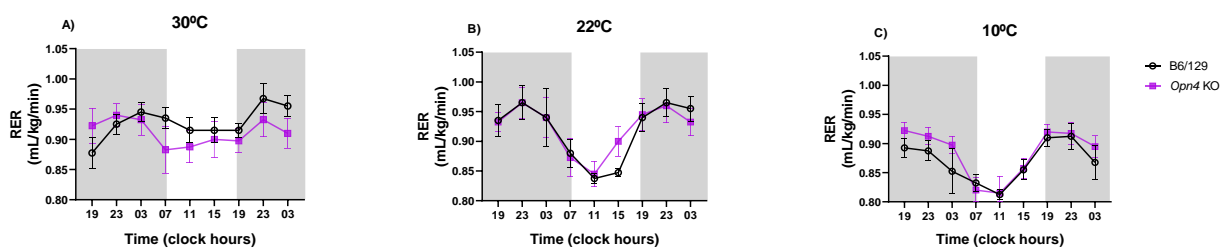


Figura 9. RER (razão de troca respiratória) em animais WT e *Opn4* KO. (A) 30°C, (B) 22°C e (C) 10°C. Os dados foram plotados como a média de RER \pm EPM (n=4). Área sombreada (A-C) = fase de escuro. As diferenças entre os genótipos foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

5.4 Telemetria de atividade locomotora e temperatura corpórea interna.

Em nosso estudo, a temperatura interna e a atividade locomotora dos camundongos machos genótipos WT e *Opn4* KO foram avaliadas sob temperatura termoneutra de 30°C e em desafio de frio a 22°C, após duas semanas iniciais em termoneutralidade. Animais *Opn4* KO não apresentaram diferenças significativas na atividade locomotora em comparação com animais WT nas duas condições térmicas avaliadas (Figura 10A, B, C e D). Embora a amplitude da atividade pareça ser maior nos animais *Opn4* KO a 30°C, o ritmo de atividade locomotora de ambos os genótipos permaneceu sincronizado com o ciclo LD 12:12 (Figura 10A, B, C e D).

Observamos um aumento no ZT13 a 30°C em comparação a 22°C dos animais *Opn4* KO de (Figura 10F).

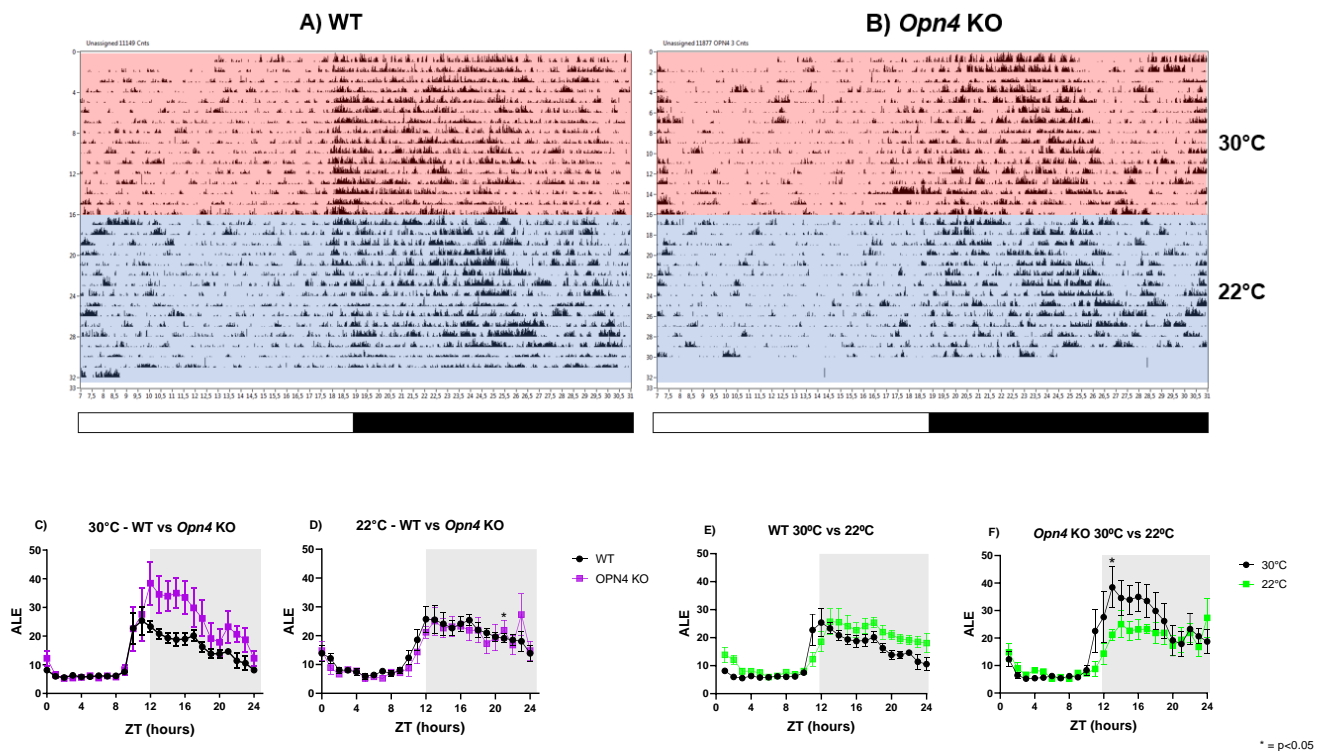


Figura 10. Actogramas representativos de animal WT (A) e *Opn4* KO (B). Horas circadianas no eixo X e dias no eixo Y. Barra vermelha corresponde a 2 semanas em 30°C, barra azul a 2 semanas a 22°C, barra branca fase de claro e barra preta fase de escuro. Comparação do perfil diário de atividade locomotora entre animais de diferentes genótipos a 30°C (C) e 22°C (D), e em ambas as temperaturas entre animais WT (E) e *Opn4* KO (F). Os dados foram plotados como a média \pm EPM (n= 4-8) para cada ZT ao longo de 24 h. Área sombreada em C a F = fase do escuro.

Ambos os genótipos também exibiram temperaturas corporais rítmicas como pode se ver pela Figura 11 (A-D). E o pós-teste não identificou diferenças entre os genótipos (Figura 11A,B) ou entre as temperaturas (Figura 11C,D).

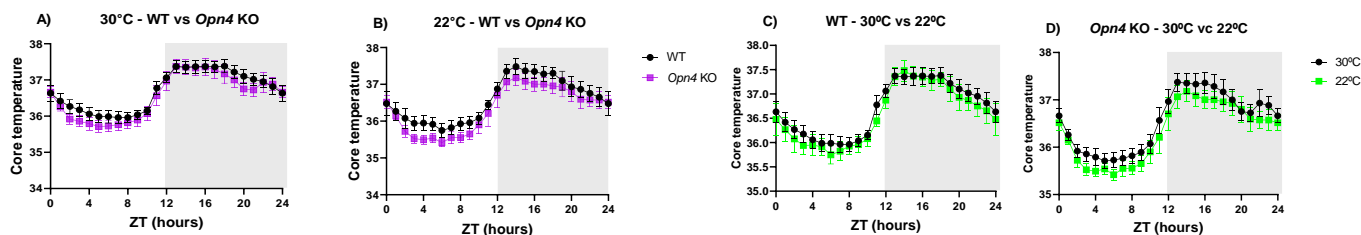


Figura 11. Comparação do perfil diário de temperatura entre animais de diferentes genótipos a 30°C (A) e 22°C (B), e entre animais WT (C) e *Opn4* KO (D) em diferentes temperaturas. Os dados foram plotados como a média \pm EPM (n= 6-8) para cada ZT ao longo de 24 h. Área sombreada em A a D = fase do escuro.

Usamos o programa ClockLab Analysis (Actimetrics, EUA) o qual permite analisar registros obtidos de praticamente qualquer sistema de coleta de dados circadianos. O *onset* que determina o início da atividade locomotora espontânea (ALE) dos animais tanto em 30°C como em 22°C é o ZT $10,47 \pm 0,18$ para WT e ZT $11,54 \pm 0,12$ para *Opn4* KO (Figura 12A). Já o final da atividade, *offset*, em 30°C como em 22°C está no ZT $20,52 \pm 0,81$ para WT e ZT $20,95 \pm 0,76$ para *Opn4* KO (Figura 12B). A acrofase representa o horário da maior intensidade da atividade locomotora (Figura 12C) ou da temperatura corpórea interna (Figuras 13C). Observamos que o pico de maior atividade locomotora em 30°C como em 22°C está no ZT $15,98 \pm 0,84$ para WT e ZT $16,03 \pm 1,36$ para *Opn4* KO (Figura 12C).

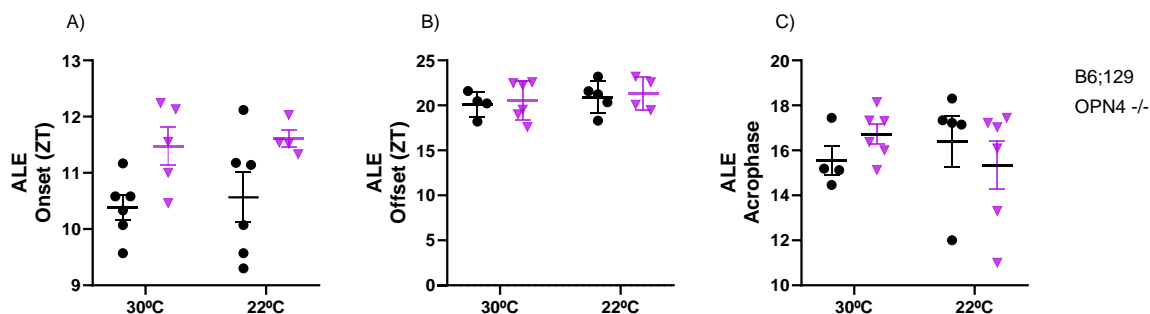


Figura 12. *Onset* (A), *offset* (B) e acrofase (C) da atividade locomotora dos animais de diferentes genótipos a 30°C e 22°C, submetidos a diferentes temperaturas. A diferença entre os animais WT e *Opn4* KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

Para a temperatura corporal interna, o *onset* dos animais WT tanto em 30°C como em 22°C está em ZT $10,52 \pm 0,37$ e dos *Opn4* KO ZT $9,76 \pm 0,05$ (Figura 13A), *offset* para animais WT é ZT $22,54 \pm 1,21$ e para *Opn4* KO ZT $21,74 \pm 0,38$ (Figura 13B), valores de ZT próximos aos *onset* e *offset* da ALE. Observamos que o pico temperatura corpórea em 30°C como em 22°C está no ZT $16,83 \pm 1,45$ para WT e ZT $15,86 \pm 0,41$ para *Opn4* KO (Figura 13C).

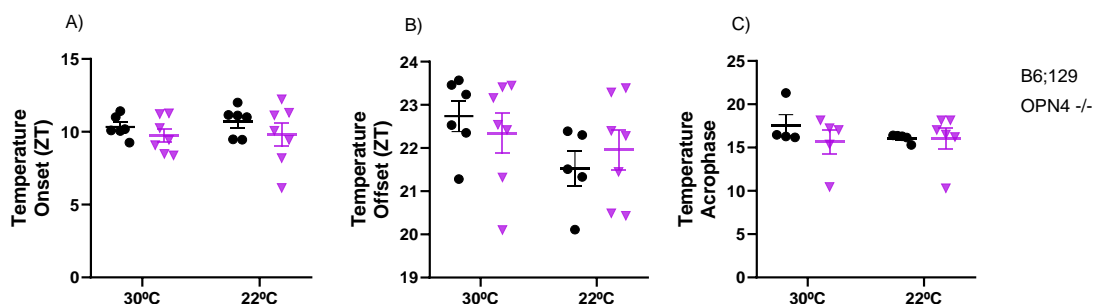


Figura 13. *Onset* (A), *offset* (B) e acrofase (C) da temperatura dos animais de diferentes genótipos a 30°C e 22°C, submetidos a diferentes temperaturas. A diferença entre os animais WT e *Opn4* KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

Para analisarmos a robustez do ajuste do ritmo circadiano, foi feito o teste de Qui-Quadrado para o periodograma, que consiste na análise da probabilidade de ajuste a um determinado período (Figuras 14 e 15). A atividade locomotora (Figura 14A, B) e a temperatura corpórea (Figura 15A, B) exibiram períodos circadianos de 24 horas, não tendo sido observada alteração na % de variância e valor de Qp entre os diferentes genótipos tanto nas análises da atividade locomotora (Figura 14C, D) como da temperatura corpórea interna (Figura 15C, D), indicando que a falta de *Opn4* e a baixa temperatura não exerceram efeitos sobre o ritmo já existente.

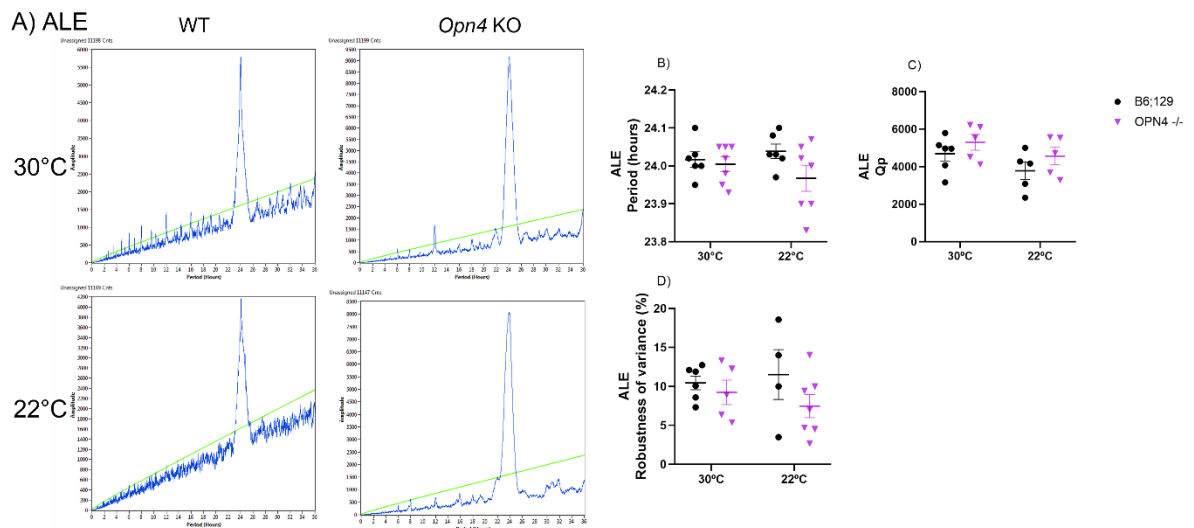


Figura 14. Periodograma representativo da atividade locomotora de animal WT e *Opn4* KO. (A) Amplitude no eixo Y e período (hours) no eixo X. Período (B), Qp (C) e robustez da variância (%) (D) da atividade locomotora de animais WT e *Opn4* KO a 30°C e 22°C. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

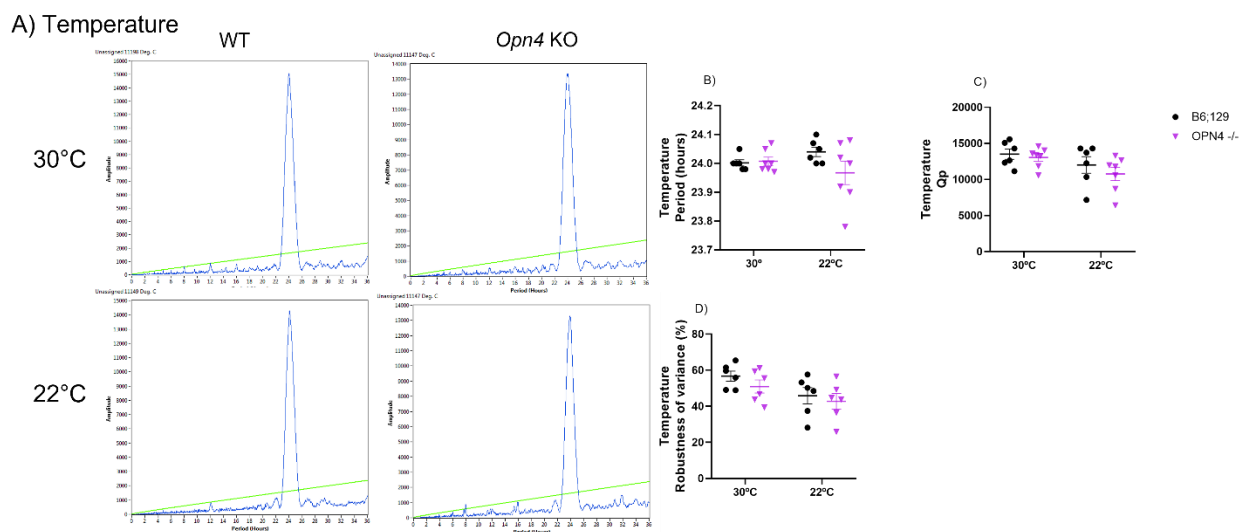


Figura 15. Periodograma representativo da temperatura de animal WT e *Opn4* KO. (A) Amplitude no eixo Y e período (hours) no eixo X. Período (B), Qp (C) e robustez da variância (%) (D) da temperatura de animais WT e *Opn4* KO a 30°C e 22°C. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni.

5.5 Termografia.

A temperatura é um importante parâmetro ambiental que influencia a fisiologia animal e a produção de calor metabólico, com isso, um dos objetivos do nosso trabalho foi obter

imagens termográficas de animais em termoneutralidade e após desafio a 22°C e para tanto, utilizamos a termografia infravermelha (IR) que é um método que mede diretamente a produção de calor. Nosso objetivo foi uma melhor compreensão dos mecanismos termorregulatórios dos animais WT e *Opn4* KO, após desafio de frio moderado.

A partir de nossos dados de análise qualitativa, verificamos que animais WT apresentaram uma maior temperatura dorsal e ventral a 30°C comparados com os animais *Opn4* KO (Figura 16A). Já a 22°C podemos observar que animais *Opn4* KO apresentaram uma maior temperatura predominantemente no BAT e ventral (região inguinal) em comparação ao WT. Na análise quantitativa, os animais WT e *Opn4* KO a 30°C mostraram temperaturas semelhantes nas regiões do BAT, caudal, inguinal e dorsal (Figura 16C, D, E e F) e nas regiões caudal e dorsal a 22°C (Figura 16D,F). A 22°C, a temperatura máxima do BAT e da região inguinal foi significativamente maior nos indivíduos *Opn4* KO quando comparados aos WT (Figuras 16C e E). Quando se comparam as respostas térmicas após o desafio de frio em cada genótipo, observa-se que os animais WT responderam com abaixamento da temperatura nas 4 regiões analisadas (Figura 16 C-F), enquanto os animais *Opn4* KO apresentaram diminuição da temperatura na cauda e dorso (Figura 16 D,F) e não mostraram variação no BAT e na região inguinal (Figura 16 C,E).

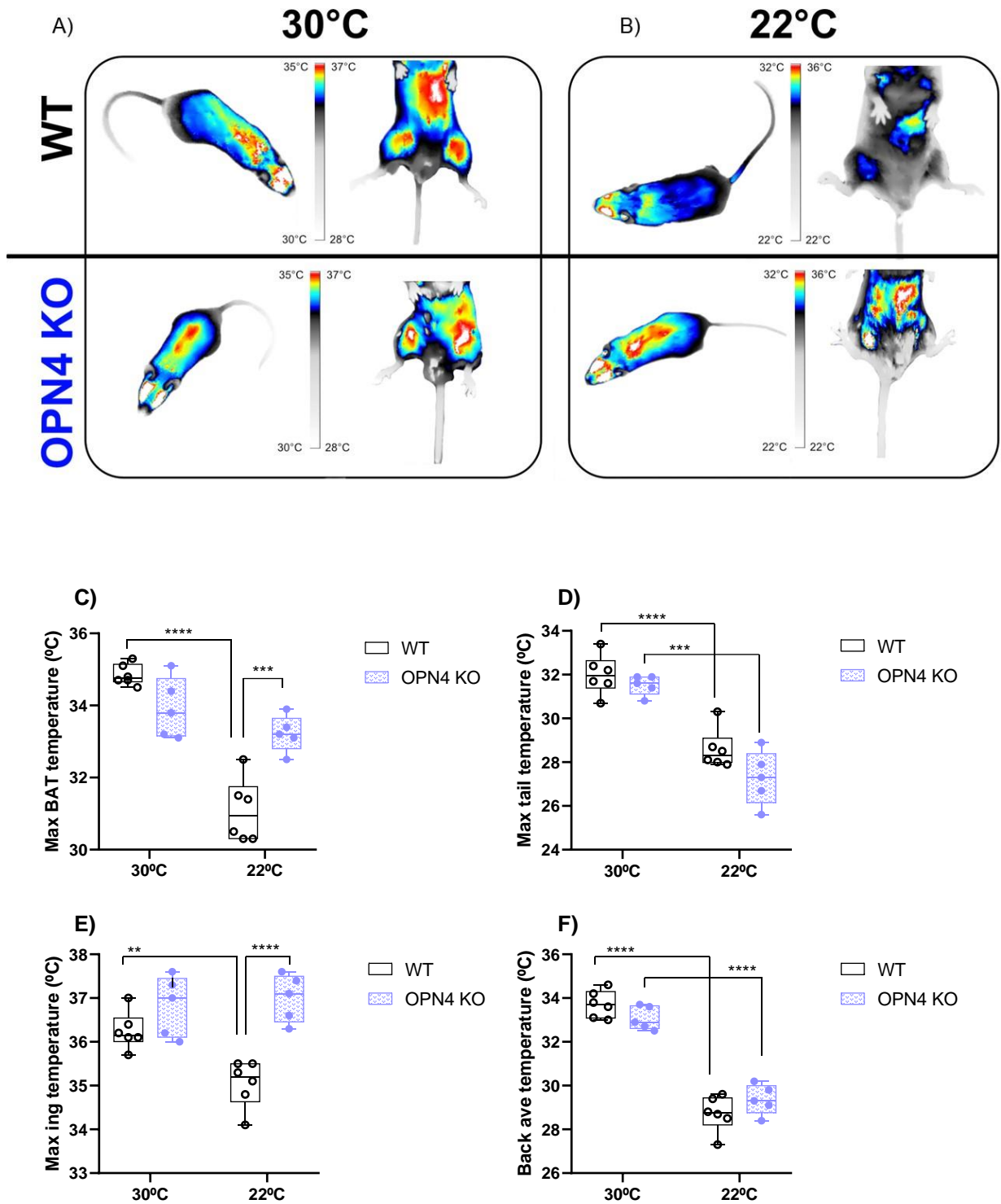


Figura 16. Análise termográfica por infravermelho de camundongos WT e *Opn4* KO. (A-B) Imagens termográficas representativas capturadas dos mesmos animais (n=5-6 por grupo) após 14 dias de aclimação a 30°C (A) e após 14 dias a 22°C (B). (C-F) Análise quantitativa das médias marginais estimadas de temperatura das regiões BAT (C), caudal (D), inguinal (E) e dorsal (F), dos animais aclimatados a 30°C e a 22°C.

5.6 Expressão gênica e proteica do marcador do tecido adiposo marrom UCP1

O tecido adiposo é um órgão endócrino responsável por exercer uma função fundamental no metabolismo energético. Classicamente, o BAT apresenta múltiplas gotículas lipídicas e mitocôndrias que contêm a proteína de desacoplamento 1 (UCP1). Na presença de UCP1, os adipócitos marrons podem converter energia química em calor, um processo conhecido como termogênese sem tremores, sendo a exposição ao frio um o ativador mais potente da termogênese nesse tecido. Embora estudos anteriores já tenham demonstrado o envolvimento direto da exposição ao frio e a expressão de *Ucp1*, nosso presente estudo sugere que animais estimulados por frio podem responder com ativação da melanopsina no coração e/ou BAT podendo favorecer a termogênese (Fenzl e Kiefer, 2014; Straat et al.; 2022). Para avaliarmos nossa hipótese, expusemos animais WT e *Opn4* KO em termoneutralidade e desafiados por frio a 22°C e coletamos o BAT a cada 4 h para avaliar a expressão rítmica dos principais genes envolvidos na termogênese. As análises foram feitas a fim de comparar animais em diferentes temperaturas, animais de diferentes genótipos a 30°C e 22°C e o perfil oscilatório de cada gene (Figuras 17, 18 e 19). Os animais WT nos ZT2, 6, 14, 18 e 22 (Figura 17A) e *Opn4* KO nos ZT2, 10 e 14 (Figura 17B) apresentaram um aumento estatisticamente significativo de *Ucp1* quando expostos ao frio em comparação aos animais em termoneutralidade, não havendo diferenças nos demais pontos temporais, embora no perfil geral as expressões a 22°C estivessem sempre maiores do que na termoneutralidade. Observamos um perfil oscilatório de *Ucp1* no animal *Opn4* KO a 30°C e nos animais WT e *Opn4* KO a 22 °C (Figura 17A,B,C). Curiosamente, há uma inversão da expressão máxima que está presente na fase de claro nos animais KO e na fase de escuro nos WT (Figura 17A,B). Ainda, *Ucp1* foi mais expressa nos ZTs 2 e 22 em animais *Opn4* KO em comparação ao WT a 30°C (Figura 17C).

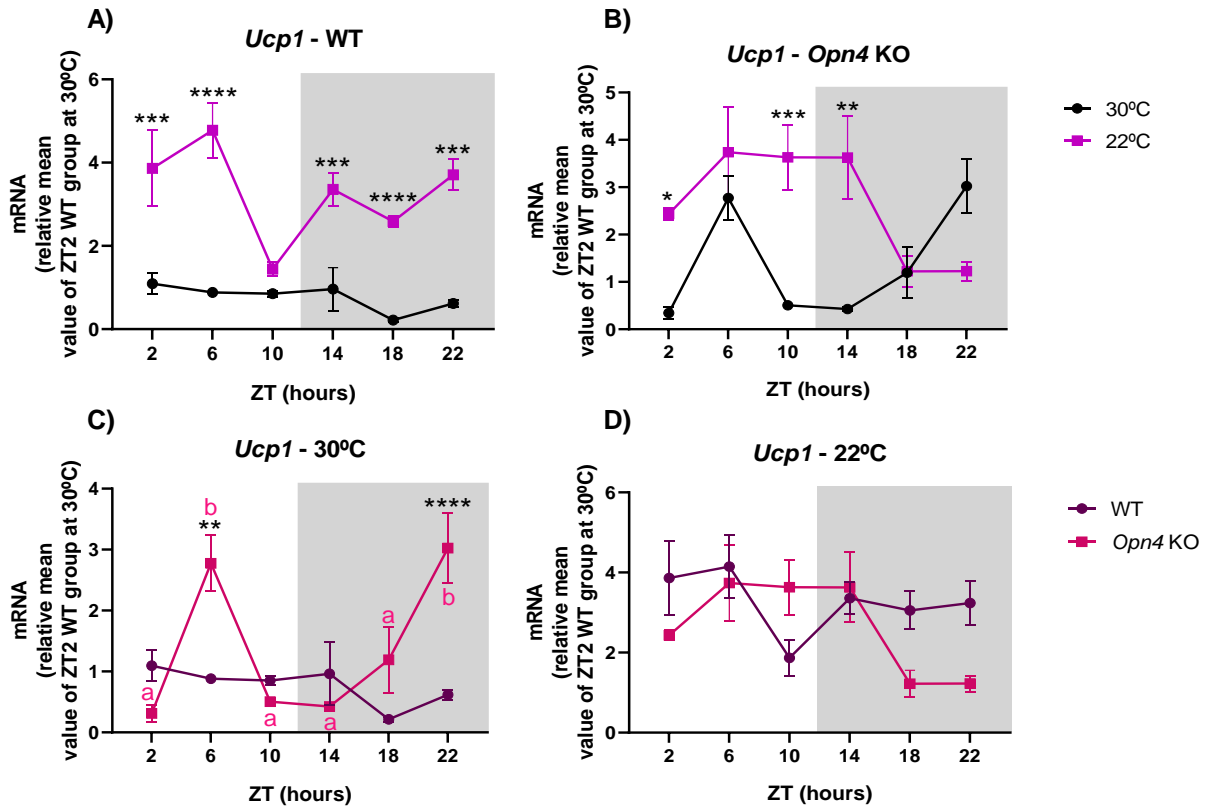


Figura 17. Expressão de *Ucp1*. Comparação do perfil diário em diferentes temperaturas entre animais WT (A) e *Opn4* KO (B), e diferentes genótipos a 30°C (C) e 22°C (D). Os ZTs 2, 6 e 10 representam a fase de claro, ZTs 14, 18 e 22 representam a fase de escuro em ciclos de LD. Os dados foram plotados como a média \pm EPM (n= 3-4) para cada ZT ao longo de 24 h. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. As letras representam a diferença temporal e os asteriscos a diferença entre os grupos.

Após caracterizarmos o perfil de expressão genica circadiana de *Ucp1* (Figura 17 A-D) e o ritmo de temperatura corpórea (11 A-D), buscamos avaliar os níveis de proteína em um ZT no meio da fase de claro (ZT6), momento em que os animais não estão em atividade e um ZT no meio da fase de escuto (ZT14) momento de atividade dos animais. Não foi possível observamos diferença entre os genótipos e os ZTs nas diferentes temperaturas (Figura 18).

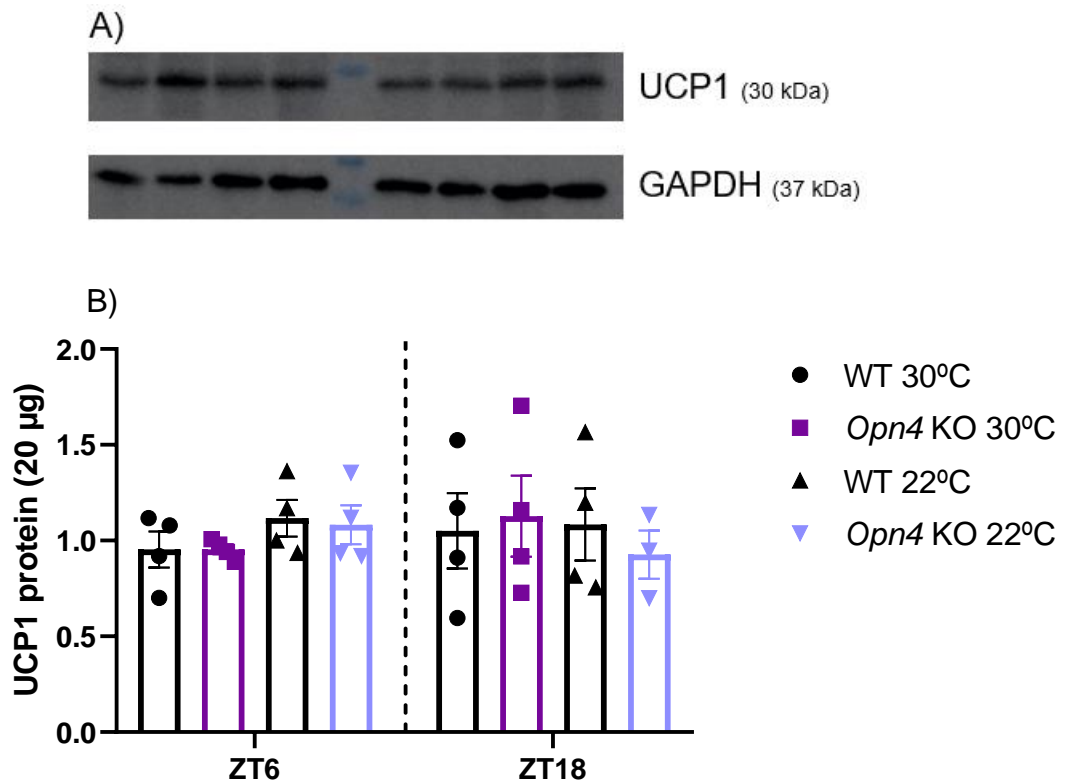


Figura 18. Níveis de proteína UCP1. (A) membranas representativas de Western Blot das proteínas UCP1 e GAPDH. (B) níveis totais de proteína UCP1 (20 ug) nos ZTs 6 e 18 em camundongos WT e *Opn4* KO expostos a 30° e 22°C por duas semanas. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two-Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni (n=3-4).

5.7 Expressão gênica do controle circadiano do tecido adiposo marrom

Os genes do relógio biológico estão presentes nas mais diversas células e tecidos do corpo na maioria das espécies estudadas, cuja função está muito além dos ciclos de sono-vigília, mas também orquestrando toda a fisiologia do organismo. Esses genes e proteínas também caracterizam o BAT murino, uma vez que estão envolvidos no controle das funções de adipogênese e termogênese. Estudos anteriores em diversas linhagens de camundongos mutantes dos genes do relógio demonstraram alterações na morfologia e função do BAT, ressaltando a importância do relógio circadiano no metabolismo e na termogênese (Straat et al.; 2022). Com o objetivo de investigar o papel do relógio na termogênese no BAT em animais

WT e *Opn4* KO em termoneutralidade e desafiados por frio, demonstramos o perfil oscilatório de expressão gênica ao longo de 24 horas dos principais componentes do relógio envolvidos no metabolismo: *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba*. A expressão do gene *Per2* apresentou-se aumentada nos animais WT a 22°C no ZT14 com um perfil oscilatório em comparação a 30°C quando não houve diferenças entre os pontos temporais (Figura 19A) enquanto nos *Opn4* KO em ambas as temperaturas houve oscilação com pico no ZT14 (Figura 19B). Ambos os genótipos apresentaram um aumento da expressão do gene *Per2* a 22°C no ZT14, fase em que os animais estão em atividade (Figura 19D). Os genes *Per2* e *Bmal1* ciclam em fases quase opostas, como já descrito anteriormente. No ZT22, os animais WT apresentaram aumento da expressão de *Bmal1* a 22°C comparado a termoneutralidade (Figura 19E), sendo que nos animais KO não houve diferenças entre as temperaturas (Figura 19F). Em ambos os genótipos, a oscilação é evidente, com pico de expressão na fase de claro. Observamos um aumento de *Bmal1* no início da fase de claro em ZT2 em ambos os genótipos a 30°C e 22°C (Figura 19G,H). Por sua vez, *Rev-erba* teve o pico de expressão na fase clara em ambas as temperaturas e genótipos (Figura 19I,J), significativamente maior a 30°C nos ZTs 6 e 10 (Figura 19J) do que a 22°C em animais KO. A 30°C a expressão foi significativamente maior em ZT2 nos animais WT comparados aos KO (Figura 19K) enquanto a 22°C essa diferença apareceu no ZT6 (Figura 19L).

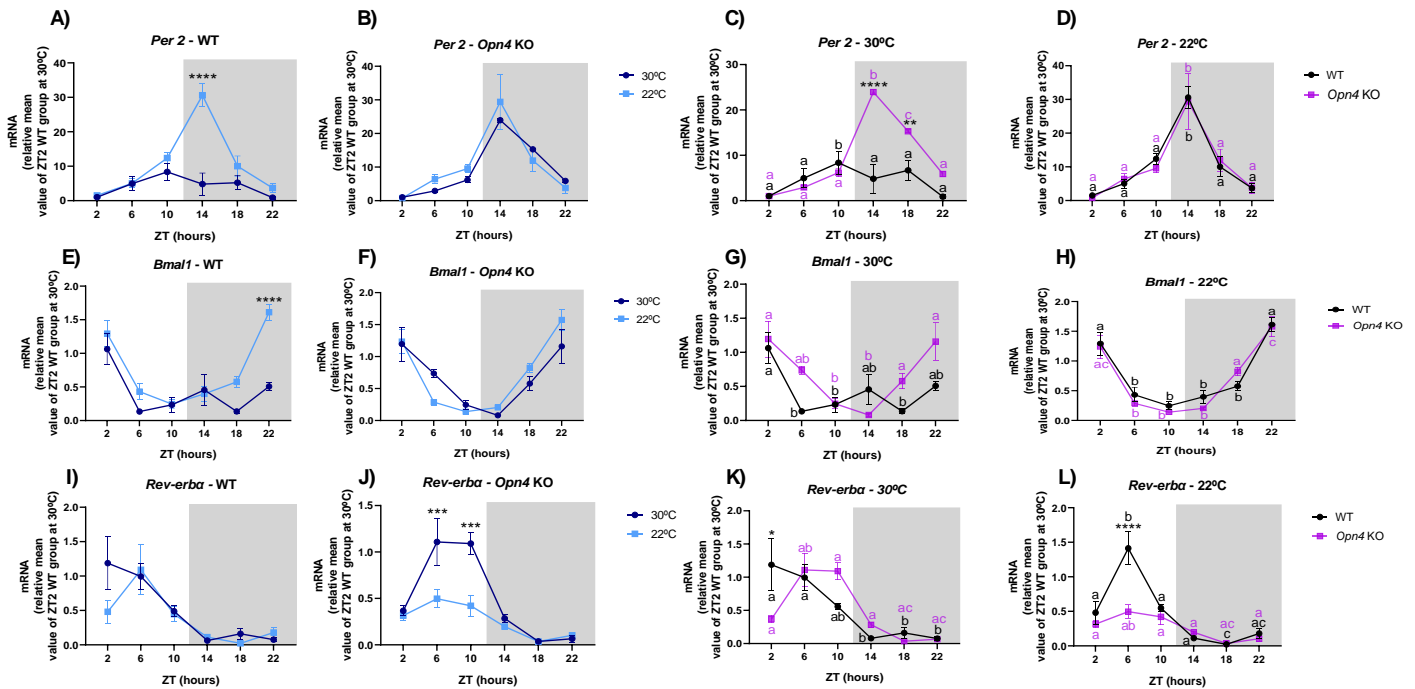


Figura 19. Expressão dos genes do relógio *Per2* (A, B, C e D), *Bmal1* (E, F, G e H) e *Rev-erba* (I, J, K e L).

Comparação do perfil diário em diferentes temperaturas entre animais WT (A, E, I) e *Opn4* KO (B, F, J), e diferentes genótipos a 30°C (C, G, K) e 22°C (D, H, L). Os ZTs 2, 6 e 10 representam a fase de claro, ZTs 14, 18 e 22 representam a fase de escuro em ciclos de LD. Os dados foram plotados como a média \pm EPM (n= 3-4) para cada ZT ao longo de 24 h. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. As letras representam a diferença temporal e os asteriscos a diferença entre os grupos.

5.8 Expressão gênica dos receptores de peptídeos natriuréticos no tecido adiposo marrom

Os peptídeos natriuréticos participam de vários processos fisiológicos e essa ampla variedade de respostas é obtida a partir das ações distintas de peptídeos natriuréticos individuais interagindo com receptores guanilil ciclase específicos. Estudos demonstraram em adipócitos humanos que o NP atrial (ANP) e o NP ventricular (BNP) ativaram o coativador PPAR γ -1 α (PGC-1 α) e a expressão de UCP1, induziram a mitocôndriogênese e aumentaram a respiração desacoplada e total. Além, camundongos expostos a baixas temperaturas (4°C) apresentaram maior expressão do receptor de sinalização de NP, *Npra*, e menor expressão do receptor de

de puração de NPs (*Nprc*) no BAT e no tecido adiposo branco (WAT) (Bordicchia et al., 2012). Após os animais passarem 2 semanas em termoneutralidade, não foram observadas diferenças na expressão do receptor *Npra* nos animais WT e *Opn4* KO quando comparados em diferentes temperaturas (Figura 20A, B). Porém quando comparados os diferentes genótipos nas duas temperaturas, animais *Opn4* KO tiveram um aumento significativo da expressão no ZT22 a 30°C (Figura 20C) e os WT no ZT2 a 22°C (Figura 20D). A expressão de *Nprb* teve um aumento nos animais WT nos ZTs 14, 18 e 22 (Figura 20E) quando expostos a baixa temperatura, enquanto não houve diferença entre as temperaturas nos animais *Opn4* KO (Figura 20F). A 30 e a 22°C observa-se nas 2 temperaturas o perfil oscilatório nos animais WT, com maiores expressões na fase de escuro (Figura 20G,H). Quanto à expressão de *Nprc*, não houve diferença em cada genótipo entre as temperaturas (Figura 20I,J) ou entre os genótipos a 30°C (Figura 20K), mas observamos um aumento em animais WT no ZT6 a 22°C quando comparado com animais *Opn4* KO (Figura 20L). Ainda, verifica-se um perfil oscilatório nessa temperatura, com maior expressão na fase de claro (Figura 20L).

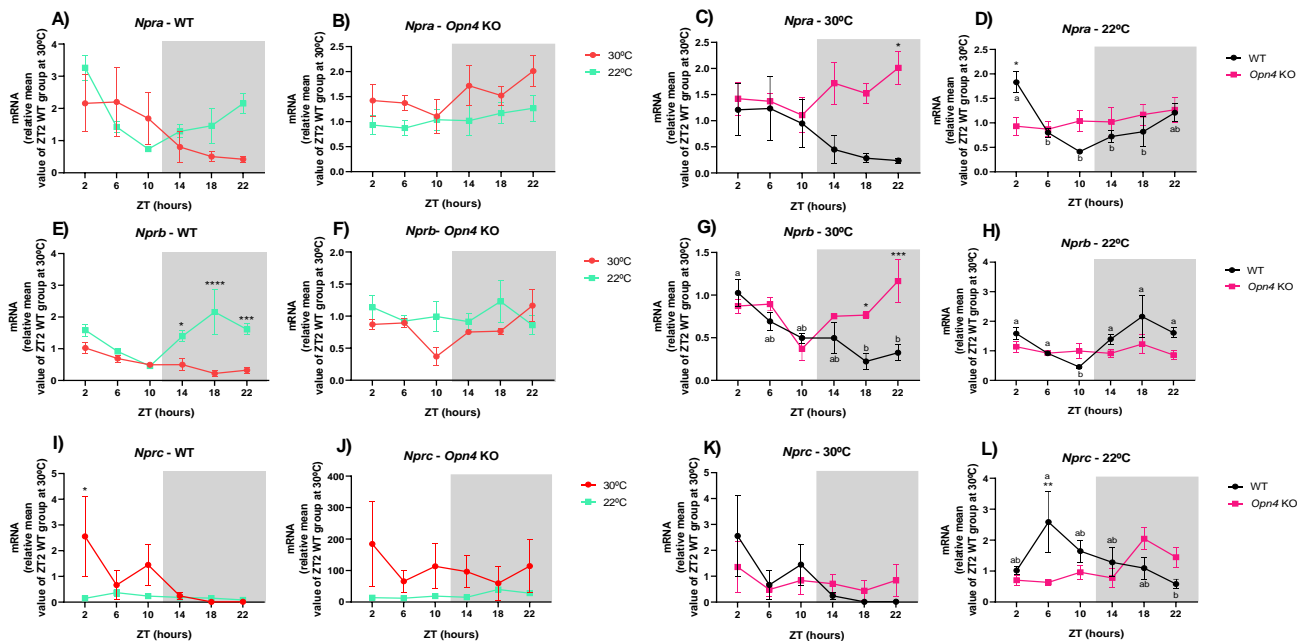


Figura 20. Expressão dos receptores de NPs *Npra* (A, B, C e D), *Nprb* (E, F, G e H) e *Nprc* (I, J, K e L).

Comparação do perfil diário em diferentes temperaturas entre animais WT (A, E, I) e *Opn4* KO (B, F, J), e diferentes

genótipos a 30°C (C, G, K) e 22°C (D, H, L). Os ZTs 2, 6 e 10 representam a fase de claro, ZTs 14, 18 e 22 representam a fase de escuro em ciclos de LD. Os dados foram plotados como a média ± EPM (n= 3-4) para cada ZT ao longo de 24 h. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas foram analisadas por *Two Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. As letras representam a diferença temporal e os asteriscos a diferença entre os grupos.

5.9 Avaliação dos níveis plasmáticos de ANP e BNP

Paralelamente à expressão circadiana dos receptores de NPs, avaliamos os níveis de ANP e BNP plasmáticos em animais WT e *Opn4* KO em termoneutralidade e desafiados por frio a 22°C nos ZTs 2 e 14. Em animais WT observamos um aumento do ANP em animais a 22°C no ZT14 quando comparados ao ZT2 (Figura 21A) e também um aumento do BNP a 22°C no ZT14 quando comparado com 30°C (Figura 21E). *Opn4* KO não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes temperaturas e entre os ZTs, embora vejamos uma leve tendência de aumento nos níveis plasmáticos de ANP a 22°C na fase de escuro (ZT14, Figura 21B). Para talvez melhorarmos nossa resposta, precisaríamos aumentar o *n* amostral.

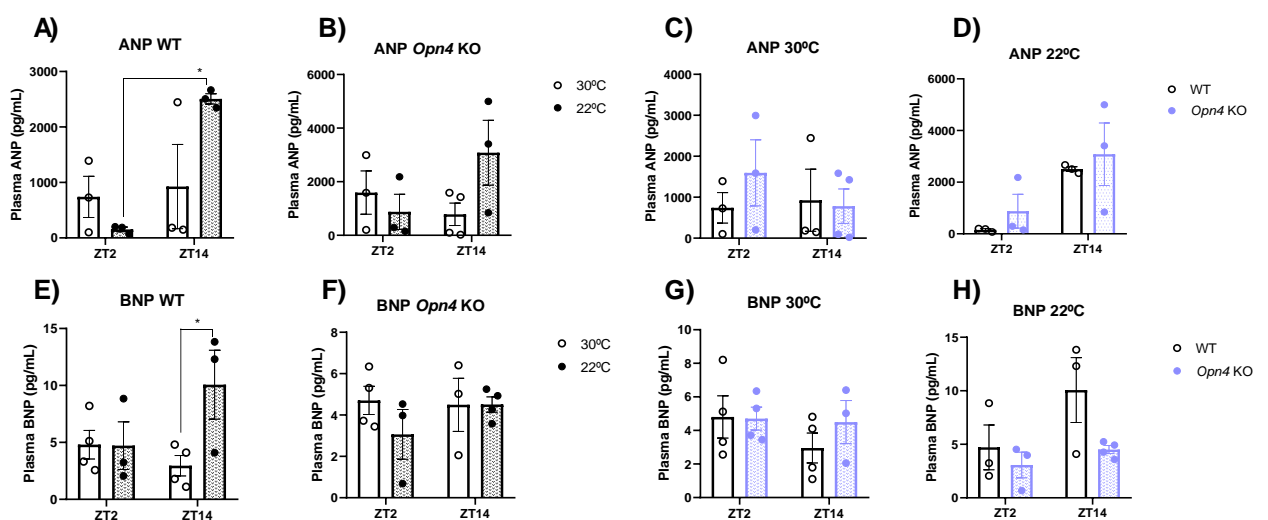


Figura 21. Níveis plasmáticos de ANP (A-D) e BNP (E-H) nos ZTs 2 e 14. Camundongos WT e *Opn4* KO expostos por duas semanas a 30° ou 22°C. As diferenças entre os animais WT e KO submetidos a diferentes temperaturas e ZTs foram analisadas por *Two-Way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni (n=3-4).

6. Discussão

As variações da temperatura ambiental são responsáveis por demandar produção e/ou dissipação de calor e/ou gasto energético nos animais endotérmicos para manterem uma temperatura corporal constante independentemente do ambiente. A temperatura corporal é mantida por centros termorreguladores localizados no hipotálamo anterior pré-óptico, organizando respostas comportamentais e autônomas. A termoneutralidade refere-se quando a taxa metabólica e a atividade termogênica são mínimas, mantida pelo metabolismo basal do animal ($\sim 30^{\circ}\text{C}$ para camundongos). No entanto, a grande maioria dos estudos presentes na literatura foi conduzida com camundongos em temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$), sendo assim expostos cronicamente ao estresse pelo frio, temperatura confortável para humanos (Gordon, 1995; Ginting et al., 2023). A exposição crônica de animais a temperaturas inferiores a zona termoneutra leva à ativação de um processo neuro-endócrino sistêmico, chamado de termogênese adaptativa ou facultativa sem tremores. Quando ativado, o sistema nervoso simpático libera o neurotransmissor norepinefrina que irá desencadear uma sinalização por meio do receptor β_3 -adrenérgico, ocorrendo a ativação da termogênese do BAT (Carpentier et al., 2023). Porém, pouco se sabe sobre outros estímulos ambientais ou internos que poderiam ativar o BAT.

O nosso presente estudo demonstrou que a zona termoneutra de animais B6;129 é entre 26 e 36°C (Figura 6A, B) e para *Opn4* KO entre $23,5$ e 36°C (Figura 6A, C). Também observamos através do consumo de O_2 e do volume expirado de CO_2 que a taxa metabólica de ambos os genótipos foi idêntica a 30°C (Figura 7A, 8A, 9A), mostrando maior metabolismo na fase de escuro quando os animais estavam em sua fase de atividade. Conforme foram expostos a temperaturas mais baixas, verifica-se um aumento crescente no consumo de O_2 e no volume de CO_2 expirado nos animais *Opn4* KO em relação aos animais WT a 22°C (Figura 7B, 8B) e a 10°C (Figura 7C, 8C). Demonstrando que animais *Opn4* KO aumentaram seu metabolismo

muito mais do que animais WT, de forma a garantir a termorregulação frente ao mesmo desafio de frio. Nosso grupo demonstrou previamente que a pele de camundongos *Opn4* KO possui uma camada de tecido adiposo (hipoderme) cerca de três vezes mais fina que os animais B6;129 (Sua-Céspedes et al., 2023), o que poderia ser uma das causas da necessidade de aumentar em maior grau o consumo de O₂ frente ao desafio de frio.

O aumento no consumo de O₂ e no volume expirado de CO₂ nos animais *Opn4* KO diferem dos dados dos pesquisadores do grupo de Nayak (2020) em camundongos *Opn3* KO. Estes apresentaram menor consumo de oxigênio e expiração de dióxido de carbono do que os controles nas temperaturas ambientes mais baixas (22°C, 16°C e 10°C). Porém quando a temperatura ambiente foi restaurada à termoneutralidade (30°C), as diferenças desapareceram, sugerindo que essas alterações representam respostas adaptativas diferenciais entre os genótipos. Ainda, infere-se que OPN3 e OPN4 podem ter papéis diferentes na regulação do metabolismo.

As opsinas apresentam seu papel clássico como fotorreceptores visuais e não visuais, estando presentes em tecidos extraoculares, mas ainda não há evidências suficientes sobre suas funções não fotorreceptoras nesses outros tecidos (de Assis et al., 2021; Moraes et al., 2021). A fim de entender melhor a funcionalidade das opsinas em tecidos cegos, muitos trabalhos demonstraram que as opsinas também são moléculas termosensoras (Shen et al., 2011; Pérez-Cerezales et al., 2015; Sokabe et al., 2016; Leung e Montell, 2017; Moraes et al., 2017; Roy et al., 2020; Zanetti et al., dados não publicados). Ademais, estudos mais recentes vêm demonstrando a função de algumas opsinas no metabolismo, como a OPN3, OPN4 e OPN5 (Ayturk et al., 2015; Ondrusova et al., 2017; Nayak et al., 2020; Sato et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Sabemos que a melanopsina é responsável pelo ajuste do fotoarrastamento circadiano. O ritmo circadiano é responsável por orquestrar eventos internos em uma programação diária

para garantir que os sistemas corporais sejam coordenados com o tempo ambiental e uns com os outros. O oscilador central em mamíferos está localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) no hipotálamo. Os relógios biológicos residem não apenas em regiões do cérebro, mas também em órgãos periféricos e até mesmo em células em cultura. Um sistema de cronometragem diário endógeno é necessário para antecipar a mudança ambiental, iniciar ajustes internos antes do tempo ambiental apropriado e manter relações de fase adequadas entre os sistemas internos. As interrupções na homeostase circadiana têm um impacto pronunciado no funcionamento fisiológico, na saúde geral e na susceptibilidade a doenças (Rosmalen et al., 2021). Nos mamíferos, além da luz, outras pistas de arrastamento, como ingestão de alimentos ou temperatura, até mesmo estímulos sociais, podem redefinir o ritmo circadiano. Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar a contribuição da melanopsina no ajuste dos ritmos de atividade locomotora por luz (Panda et al., 2002; 2003). Neste estudo foi demonstrado que camundongos *Opn4* KO submetidos a ciclos de LD (8L:16D) apresentaram atividade locomotora similar aos animais C57Bl/6J ou rd/rd (sem cones e bastonetes), porém camundongos *Opn4* KO;rd/rd não foram capazes de sincronizar ao ciclo LD. Vale mencionar que neste estudo a variável temperatura ambiental não foi considerada, sendo os registros de atividade realizados em 22°C. Outro ponto importante é que a atividade locomotora foi avaliada em roda de atividade e o ritmo de temperatura interna não foi avaliado. Perguntamo-nos como seria a atividade locomotora e temperatura corpórea de animais WT e *Opn4* KO, aclimatados sob temperatura termoneutra de 30°C e desafiados por frio a 22°C. Observamos que animais *Opn4* KO não apresentaram diferenças significativas na atividade locomotora e temperatura corpórea em comparação com animais WT em nenhuma das temperaturas testadas (Figura 9C, D, 10C, D). No entanto, parece haver uma tendência de aumento de atividade na ausência de OPN4 a 30°C quando comparado aos animais WT (Figura 9A), além de aumento de atividade nos animais KO a 30°C comparado a 22°C (Figura 9C). Nota-se a existência de ritmos de

atividade locomotora e de temperatura corporal tanto dos animais WT como *Opn4* KO, ambos permanecendo sincronizados com o ciclo LD 12:12 (Figura 9A-FD; 10A-D). Ademais observamos também que o período do ritmo tanto da atividade locomotora (Figura 13A-D) como da temperatura corpórea (Figura 14A-D) foi de aproximadamente 24 h demonstrando um perfil circadiano, sem diferenças significativas no início e final de atividade (11A,B) e temperatura corpórea (12A, B) quando submetidos a 30°C ou a 22°C. Diversos trabalhos sugerem que a maioria das células do corpo dos mamíferos usa de maneira semelhante sinais internos de arrastamento para sincronizar os padrões circadianos de expressão gênica com o resto do corpo. Atualmente, sabe-se que a maioria das células dos mamíferos contém osciladores circadianos autônomos (Buhr et al., 2010; Moraes et al., 2021). Sabendo que os ciclos de temperatura são um fator ambiental que exerce efeitos sobre os ritmos biológicos, Buhr e colaboradores em 2010 demonstraram através de registros de bioluminescência em camundongos expressando o gene da luciferase no promotor de *Per2*, *Per2::Luc*, que o NSQ é resistente a mudanças térmicas, enquanto tecidos periféricos destes animais são sensíveis à variação de temperatura.

Nossos dados de termografia mostraram que animais *Opn4* KO tiveram uma temperatura maior no BAT e na região inguinal quando comparado com WT a 22°C (Figura 16C,E), o que sugere a necessidade de uma maior produção de calor. Como mencionado acima, nosso grupo (Sua-Cespedes et al., 2023) demonstrou, através de análise histológica, que a ausência de OPN4 levou à diminuição da camada de tecido adiposo branco hipodérmico, além de uma menor quantidade de pelos na região ventral desses animais. Estas características sugerem que, quando os animais *Opn4* KO são desafiados por frio, têm um metabolismo aumentado e o seu mecanismo de termorregulação periférica dispersa o calor gerado devida sua camada de gordura mais fina. Estes resultados ainda poderiam indicar que a falta de OPN4 contribui para o aumento do metabolismo e por conta da dispersão de calor não teria sido

possível observar alterações na temperatura corpórea interna na análise de telemetria. Tendo em vista que o BAT e o WAT inguinal de animais KO apresentam maior temperatura que WT sob desafio de 22°C, seria de se esperar que a expressão gênica e proteica de UCP1, indicador de termogênese sem tremor estivesse aumentada no BAT nessas condições. De fato, os transcritos de UCP1 estão marcadamente elevados em ambos os genótipos a 22°C em comparação com a termoneutralidade (Figura 17A,B). Muito provavelmente por limitações técnicas, não houve correspondência na expressão proteica, que não se mostrou alterada nos genótipos e nas condições testadas (Figura 18).

Muitas funções do metabolismo estão sob o controle circadiano, a fim de manter o equilíbrio homeostático ao longo do dia. O BAT murino é caracterizado pela expressão dos genes circadianos, assim como proteínas envolvidas na função adiposa e termogênese (Zvonic et al., 2006). Através do sequenciamento de RNA, descobriu-se que cerca de 8% de todos os genes que codificam proteínas no BAT flutuam em um ciclo de 24 horas, duas vezes mais do que no WAT (Zhang et al., 2014). Diversos trabalhos vêm demonstrando que camundongos nocautes para algum gene do relógio sofrem alterações na morfologia ou funcionalidade do BAT. Estudos com camundongos nocautes para o gene *Clock* que foram alimentados com dieta rica em gordura (*high fat*) apresentaram síndrome metabólica, altos níveis de gordura na corrente sanguínea e o BAT com um acúmulo excessivo de lipídios, perdendo sua característica multilocular (Turek et al., 2005). Os animais nocautes de *Bmal1* também tiveram um aumento na obesidade induzida por dieta (Shi et al., 2013). Curiosamente, estudos demonstraram a relação de UCP1 e os genes *Per2* e *Rev-erba*. Camundongos *Per2* nocautes quando expostos ao frio tiveram uma termogênese adaptativa menor tornando-os mais sensíveis a essa exposição. Ademais, esse mesmo estudo mostrou que após a exposição ao frio, o fator de choque térmico 1 (HSF1) induziu *Per2* no BAT. Posteriormente, o PER2 como co-ativador de PPAR α aumentou a expressão de *Ucp1*. PER2 também aumentou a expressão da proteína de ligação de

ácidos graxos 3 (*Fabp3*), uma proteína importante para transportar ácidos graxos livres do citoplasma para as mitocôndrias para ativar a UCP1. Assim, PER2 é um componente fundamental para a ativação da expressão de *Ucp1*. Já camundongos expostos ao frio tiveram uma redução drástica para o gene *Rev-erba* e um aumento na expressão de *Ucp1*, mostrando sua relação inversa com a expressão de *Ucp1* sugerindo que o *Rev-erba* pode provocar regulação termogênica por meio da repressão do gene *Ucp1*. A perda genética de *Rev-erba* também aboliu os ritmos normais de temperatura corporal e atividade (Gerhart-Hines et al., 2013).

As nossas presentes descobertas sugerem que OPN4 participa da regulação dos genes de relógio quando o animal foi exposto a diferentes temperaturas, tendo um importante papel para a regulação do BAT. Observamos um aumento nos transcritos de *Per 2* no ZT14 em animais WT apenas a 22°C (Figura 19A,C,D) enquanto animais *Opn4* KO apresentaram o mesmo perfil oscilatório a 30°C e a 22°C, ambos com pico de expressão no ZT14 (Figura 19 B,C,D). Mostramos que a melanopsina regula negativamente o gene *Per2* sob condições de termoneutralidade e a expressão é modulada após exposição ao frio e na sua ausência essa resposta se perde. Durante minha iniciação científica (Zanetti et al., em preparação), demonstramos que células de pré-adipócitos 3T3-L1 apresentam um perfil oscilatório de bioluminescência de *Per1::Luc* e *Bmal1::Luc*, o qual reflete o perfil oscilatório de transcrição dos genes *Per1* e *Bmal1* quando mantidas em temperatura constante de 37°C ou em ciclo de 34°C/37°C 3:21, sob escuro constante. Adicionalmente, o pulso de baixa temperatura exerce um aumento na amplitude da bioluminescência de *Per1*. Em artigo do nosso grupo demonstramos em linhagens de melanócitos cutâneos de camundongos (Melan-a e B16-F10) que o aumento da expressão do gene *Per1* por calor (39,5°C) foi inibido quando a melanopsina foi bloqueada farmacologicamente, além de sua expressão proteica que foi reduzida por siRNA (Moraes et al., 2017). Nossos dados junto com os de Moraes e colaboradores mostram que a

melanopsina tem papel crucial na sinalização da termo-recepção. No presente trabalho, revelamos sua importância para a regulação do relógio local no BAT. Para o gene *Bmal1*, vimos que apenas no ZT22 os animais WT apresentaram aumento de sua expressão a 22°C comparado a termoneutralidade (Figura 19E), enquanto os animais KO apresentaram também o mesmo perfil oscilatório a 30°C e a 22°C. Ademais, o gene *Rev-erba* teve o pico de expressão na fase clara em ambas as temperaturas em animais WT (Figura 19I,K,L) e apresentou uma redução da sua expressão a 22°C em animais nocautes para melanopsina (Figura 19J,L), mostrando a relação positiva de OPN4 com o gene *Rev-erba*. Nossos dados corroboram outros trabalhos que mostraram que camundongos expostos ao frio se ajustam dramaticamente melhor às 5 da manhã (horário *Zeitgeber* 22) quando o *Rev-erba* é pouco expresso do que às 5 da tarde (ZT10) quando o *Rev-erba* é abundante (Gerhart-Hines et al., 2013), exato momento em que tivemos uma menor expressão de *Ucp1* quando os animais WT foram expostos ao frio (Figura 17A). O *Rev-erba* atua como ponto chave, integrando metabolismo com o ritmo circadiano frente a variabilidade dos desafios ambientais (Gerhart-Hines et al., 2013).

O papel fisiológico dos NPs está muito além da natriurese e diurese, sua função também é atribuída à capacidade de promover características e funções termogênicas do BAT, como já descrito anteriormente (Bordicchia et al., 2012). Esses diversos estudos mostraram que o ANP/BNP promove a lipólise dos triglicerídeos, bem como o desacoplamento da respiração mitocondrial, induzindo o escurecimento do tecido adiposo branco, o que resulta na melhora da resistência à insulina e também na ativação termogênica (Sengenès et al., 2000; Wang e 2012; Carper et al., 2020). Estudos clínicos utilizando banco de dados cardíacos mostraram que altos níveis de BNP plasmático estão associados a um aumento da temperatura corporal, evidenciando que os NPs podem ter propriedades adaptativas do controle da temperatura corpórea (Kimura et al., 2017; Kang et al., 2021).

Em nossos dados foi observado um aumento na expressão de *Nprb* em animais WT quando expostos a baixa temperatura (Figura 20E) na fase de escuro. Já em animais KO observamos um aumento na expressão dos receptores de ANP e BNP a 30°C quando comparados com os WT (Figura 20C,G). Observamos que OPN4 é importante para a ritmicidade dos receptores, uma vez ausente, esses genes perdem seu ritmo ao longo de 24 h (Figura 20D,G,H,L). Mostramos que uma temperatura pouco abaixo da zona termoneutra já foi capaz de induzir a secreção de NPs cardíacos em animais WT na fase de escuro ZT14 (Figura 21A,E), resposta perdida na ausência da melanopsina. Como mostrado acima o ZT14 foi o horário no qual tivemos um aumento de *Per2* e redução de *Rev-erba* no frio, podendo indicar a interação dos NPs e os genes de relógio para a regulação da termogênese. Como não há estudos evidenciando a comparação de animais em termoneutralidade e a 22°C avaliando peptídeos natriuréticos cardíacos, estudos futuros devem avaliar estímulos agudos a 22°C, ou estímulos crônicos a temperaturas bem mais baixas, como 6°C.

7. Conclusões

1. A faixa de termoneutralidade em animais WT e *Opn4* KO é semelhante, estando 30°C dentro desse limite;
2. Animais *Opn4* KO têm um maior aumento no seu metabolismo do que os WT, de forma a garantir a termorregulação frente ao mesmo desafio de frio;
2. Ambos os genótipos apresentam ritmicidade similar na atividade locomotora e temperatura corpórea em ambas as temperaturas, com um período do ritmo ~24 h demonstrando um perfil circadiano, ambos sincronizados com o ciclo LD 12:12;
3. A melanopsina é responsável pela regulação local no BAT dos genes de relógio *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba*, uma vez que em sua ausência há alteração na expressão desses genes;
- 4 OPN4 é importante para a ritmicidade dos receptores de NPs pois uma vez ausente, esses genes perdem seu ritmo ao longo de 24 h;
5. Temperatura pouco abaixo da zona termoneutra já é capaz de induzir a secreção de NPs cardíacos em animais selvagens;
6. A melanopsina é componente da via de sinalização da termo-recepção influenciando a resposta termogênica no BAT.

7. Referências Bibliográficas

- Aytürk DG, Castrucci AM, Carr DE, Keller SR, Provencio I. (2015) Lack of melanopsin is associated with extreme weight loss in mice upon dietary challenge. *PLoS One*. 10(5), e0127031.
- Balsalobre A, Brown SA, MarcacciL, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 289(5488), 2344-2347.
- Belle JL, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. (2002) A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 15(1), 37-44.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. (2009) Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 6(7), 544–556.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 295, 1070–1073.
- Blackshaw S, Snyder SH. (1999) Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. *J Neurosci*. 19(10), 3681-3690.
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S. (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Investig*. 122, 1022–1036.
- Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr biol*. 12(18), 1574-1583.
- Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*. 330, 379-385.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Circadian clocks*. 217, 3-27.

- Cannon B, Nedergaard JAN. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol rev.* 84(1), 277-359.
- Carpentier AC, Blondin DP, Haman F, Richard D. (2023) Brown adipose tissue—a translational perspective. *End Rev.* 44(2), 143-192.
- Carper D, Coue M, Nascimento EB, Barquissau V, Lagarde D, Pestourie C, Laurens C, Petit JV, Soty M, Monbrun L, Marques MA, Jeanson Y, Sainte-Marie Y, Mairal A, Déjean S, Tavernier G, Viguerie N, Bourlier V, Lezoualc'h F, Carrière A, Saris WHM, Astrup A, Casteilla L, Mithieux G, Lichtenbelt WVM, Langin D, Schrauwen P, Moro C. (2020). Atrial natriuretic peptide orchestrates a coordinated physiological response to fuel non-shivering thermogenesis. *Cell Rep.* 32(8), 108075.
- Castro C, Briggs W, Paschos GK, FitzGerald GA, Griffin JL. (2015) A metabolomic study of adipose tissue in mice with a disruption of the circadian system. *Mol BioSyst.* 11(7), 1897-1906.
- Clayton ZS, McCurdy CE. (2018). Short-term thermoneutral housing alters glucose metabolism and markers of adipose tissue browning in response to a high-fat diet in lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 315(4), R627-R637.
- Collins S, Sarzani R, Bordicchia M. (2014) Coordinate control of adipose 'browning' and energy expenditure by β -adrenergic and natriuretic peptide signalling. *Int J Obes Supp.* 4(1), S17-S20.
- Coué M, Moro C. (2016) Natriuretic peptide control of energy balance and glucose homeostasis. *Biochimie.* 124, 84-91.
- de Assis LVM, Moraes MN, da Silveira Cruz-Machado S, Castrucci AML. (2016) The effect of white light on normal and malignant murine melanocytes: A link between opsins, clock genes, and melanogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1863(6 Pt A), 1119-1133.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* 28(1), 89-94.

- Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper M-E, Kozak LP. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*. 387, 90-94.
- Fenzl A, Kiefer FW. (2014) Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone molbiol clin inv*. 19(1), 25-37.
- Froy O, Garaulet M. (2018) The circadian clock in white and brown adipose tissue: mechanistic, endocrine, and clinical aspects. *Endocrine Rev*. 39(3), 261-273.
- Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, Everett LJ, Loro E, Briggs ER, Bugge A, Hou C, Ferrara C, Seale P, Pryma DA, Khurana TS, Lazar MA. (2013) The nuclear receptor *Rev-erba* controls circadian thermogenic plasticity. *Nature*. 503(7476), 410-413.
- Ginting RP, Lee JM, Lee MW. (2023) The influence of ambient temperature on adipose tissue homeostasis. *Metab Dis Cancers*. 12(6), 881.
- Golombek DA, Rosenstein RE. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*. 90(3), 1063-1102.
- Gordon, CJ. (1995) Temperature regulation in laboratory rodents. *J Thermal Biol*. 20(4), 365.
- Guimarães M. (2017) Ritmo biológico é premiado com Nobel de Medicina. Pesquisa FAPESP.
- Gupta DK, Wang TJ. (2015) Natriuretic peptides and cardiometabolic health. *Circ J*. 79(8), 1647-1655.
- Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. (2019) The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology (Basel)*. 8(1), 13.
- Hughes S, Jagannath A, Rodgers J, Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. (2016) Signalling by melanopsin (OPN4) expressing photosensitive retinal ganglion cells. *Eye*. 30(2), 247-254.
- Hylander BL, Repasky EA. (2016) Thermoneutrality, mice, and cancer: a heated opinion. *Trends in Cancer*. 2(4), 166-175.

- Kang R, Nagoshi T, Kimura H, Tanaka TD, Yoshii A, Inoue Y, Morimoto S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yoshimura M. (2021). Possible association between body temperature and B-type natriuretic peptide in patients with cardiovascular diseases. *J Cardiac Fail.* 27(1), 75-82.
- Kiehn JT, Tsang AH, Heyde I, Leinweber B, Kolbe I, Leliavski A, Oster H. (2011) Circadian rhythms in adipose tissue physiology. *Comp Physiol.* 7(2), 383-427.
- Kimura H, Nagoshi T, Yoshii A, Kashiwagi Y, Tanaka Y, Ito K, Yoshino T, Tanaka TD, Yoshimura M. (2017). The thermogenic actions of natriuretic peptide in brown adipocytes: The direct measurement of the intracellular temperature using a fluorescent thermoprobe. *Sci Rep.* 7(1), 12978.
- Koyanagi M, Terakita A. (2014) Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1837(5), 710-716.
- Leung NY, Montell C. (2017) Unconventional roles of opsins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 33, 241-264.
- Liu D, Ceddia RP, Collins S. (2018) Cardiac natriuretic peptides promote adipose ‘browning’ through mTOR complex-1. *Mol metabol.* 9, 192-198.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25(4), 402-408.
- Lucas RJ, Lall GS, Allen AE, Brown TM. (2012) How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog Brain Res.* 199, 1-18.
- Madden CJ, Morrison SF. (2019) Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci lett.* 696, 225-232.
- Markus RP. (2017) A biologia do tempo: um relógio molecular. *JC Notícias.* 5758, 5.
- Marlatt KL, Ravussin, E. (2017) Brown adipose tissue: an update on recent findings. *Curr Obes Rep.* 6(4), 389-396.

- Moraes MN, de Assis LVM, Magalhães-Marques KK, Poletini MO, Lima LHG, Castrucci AML. (2017) Melanopsin, a canonical light receptor, mediates thermal activation of clock genes. *Sci Rep.* 7, 13977.
- Moraes MN, de Assis LVM, Magalhães-Marques KK, Poletini MO, de Lima LHRG, Castrucci AML. (2017) Melanopsin, a canonical light receptor, mediates thermal activation of clock genes. *Sci Rep.* 7(1), 13977.
- Moraes MN, de Assis LVM, Provencio I, Castrucci AML. (2021) Opsins outside the eye and the skin: a more complex scenario than originally thought for a classical light sensor. *Cell Tissue Res.* 385(3), 519-538.
- Nayak G, Zhang KX, Vemaraju S, Odaka Y, Buhr ED, Holt-Jones A, Kernodle S, Smith N, Upton BA, D'Souza S, Zhan JJ, Diaz N, Nguyen MT, Mukherjee R, Gordon SA, Wu G, Schmidt R, Mei X, Petts NT, Batie M, Rao S, Hogenesch JB, Nakamura T, Sweeney A, Seeley RJ, Gelder RNV, Joan Sanchez-Gurmaches J, Lang RA. (2020) Adaptive thermogenesis in mice is enhanced by opsin 3-dependent adipocyte light sensing. *Cell Rep.* 30(3), 672-686.
- Nemer M, Lavigne JP, Drouin J, Thibault G, Gannon M, Antakly T. (1986) Expression of atrial natriuretic factor gene in heart ventricular tissue. *Peptides.* 7, 1147–1152.
- Ondrusova K, Fatehi M, Barr A, Czarnecka Z, Long W, Suzuki K, Campbell S, Philippaert K, Hubert M, Tredget E, Kwan P, Touret N, Wabitsch M, Lee KY, Light PE. (2017) Subcutaneous white adipocytes express a light sensitive signaling pathway mediated via a melanopsin/TRPC channel axis. *Sci Rep.* (7), 16332.
- Ortiz BS, Hori D, Nomura Y, Yun X, Jiang H, Yong H, Chen J, Paek S, Pandey D, Sikka G, Bhatta A, Gillard A, Stepan J, Kim JH, Adachi H, Barodka VM, Romer L, An SS, Shimoda LA, Santhanam L, Berkowitz DE. (2018) Opsin 3 and 4 mediate light-induced pulmonary vasorelaxation that is potentiated by G protein-coupled receptor kinase 2 inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 314(1), L93-L106.

- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AMD, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Amdahazy M, Kay SA. (2003) Melanopsin is required for non-image forming photic responses in blind mice. *Science*. 301(5632), 525-527.
- Pérez-Cerezales S, Boryshpolets S, Afanjar O, Brandis A, Nevo R, Kiss V, Eisenbach M. (2015) Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. *Sci Rep*. 5, 16146.
- Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*. 55, 16-54.
- Poletini MO, Ramos BC, Moraes MN, Castrucci, AML. (2015) Nonvisual opsins and the regulation of peripheral clocks by light and hormones. *Photochem Photobiol*. 91(5), 1046-1055.
- Preitner N, Damiola F, Luis LM, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 110(2), 251-260.
- Price DA, Doble KE, Lee TD, Galli SM, Dunn BM, Parten B, Evans DH. (1990) The sequencing, synthesis, and biological actions of an ANP-like peptide isolated from the brain of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Biol Bull*. 178(3), 279-285.
- Projeto Encode, disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=30044>.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*. 415(6871), 493.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247(4945), 975-978.

- Rachid B, Van De Sande-Lee S, Rodovalho S, Folli F, Beltramini GC, Morari J, Pedro T, Ramalho AF, Bombassaro B, Tincani AJ, Chaim E, Pareja JC, Geloneze B, Ramos CD, Cendes F, Saad MJA, L A Velloso LA. (2015) Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. *Int J Obes*. 39(10), 1515-1522.
- Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. (2008) Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*. 135, 561–571.
- Refinetti R, Menaker M. (1992) The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Beh*. 51(3), 613-637.
- Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. (2019) Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med*. 11, 82.
- Rosmalen LV, van Dalum MJ, Appenroth D, Roodenrijs R, de Wit L, Hazlerigg DG, Hut RA. (2021) Mechanisms of temperature modulation in mammalian seasonal timing. *The FASEB J*. 35, 21605.
- Roy D, Levi K, Kiss V, Nevo R, Eisenbach M. (2020) Rhodopsin and melanopsin coexist in mammalian sperm cells and activate different signaling pathways for thermotaxis. *Sci Rep*. 10(1), 112.
- Sato M, Tsuji T, Yang K, Ren X, Dreyfuss JM., Huang, TL, Wang CH, Shamsi F, Leiria LO, Lynes MD, Yau KW, Tseng YH. (2020) Cell-autonomous light sensitivity via Opsin3 regulates fuel utilization in brown adipocytes. *PLoS biol*. 18(2), e3000630.
- Seabrook TA, Burbridge TJ, Crair MC, Huberman AD. (2017) Architecture, function, and assembly of the mouse visual system. *Annu Rev Neurosci*. 40, 499-538.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 454, 961-967.

- Sengenès C, Berlan M, de Glisezinski I, Lafontan MAX, Galitzky J. (2000) Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *The FASEB J*. 14(10), 1345-1351.
- Shichida Y, Matsuyama T. (2009) Evolution of opsins and phototransduction. *Phil Trans Royal Soc B: Biol Sci*. 364(1531), 2881-2895.
- Shen WL, Kwon Y, Adegbola AA, Luo J, Chess A, Montell C. (2011) Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science*. 331, 1333-1336.
- Shi SQ, Ansari TS, McGuinness OP, Wasserman DH, Johnson CH. (2013) Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Curr Biol*. 23(5), 372-381.
- Sikka G, Hussmann GP, Pandey D, Cao S, Hori D, Park TJ, Stepan J, Kim JH, Barodka V, Myers AC, Santhanam L, Nyhan D, Halushka MK, Koehler RC, Snyder SH, Shimoda LA, Berkowitz DE. (2014) Melanopsin mediates light-dependent relaxation in blood vessels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(50), 17977-17982.
- Sokabe T, Chen HC, Luo J, Montell CA. (2016) A switch in thermal preference in *Drosophila* larvae depends on multiple rhodopsins. *Cell Rep*. 17, 336-344.
- Spannella F, Giulietti F, Bordicchia M, Burnett JC Jr, Sarzani R. (2019) Association between cardiac natriuretic peptides and lipid profile: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 9(1), 19178.
- Straat ME, Jurado-Fasoli L, Ying Z, Nahon KJ, Janssen LG, Boon MR, Martinez-Tellez B. (2022) Cold exposure induces dynamic changes in circulating triacylglycerol species, which is dependent on intracellular lipolysis: A randomized cross-over trial. *EBioMedicine*. 86.
- Stratmann M, Schibler U. (2006) Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms*. 21(6), 494-506.
- Sua-Céspedes C, Lacerda JT, Zanetti G, David DD, Moraes MN, de Assis LV, Castrucci AML. (2023) Melanopsin (OPN4) is a novel player in skin homeostasis and attenuates UVA-induced effects. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 242, 112702.

- Sudoh, T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*. 332(6159), 78-81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo, H. (1990). C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 168(2), 863-870.
- Nissila J, Manttari S, Sarkioja T, Tuominen H, Takala T, Timonen M, Saarela S. (2012) Encephalopsin (OPN3) protein abundance in the adult mouse brain. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 198, 833–839.
- Takahashi JS. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*. 18(3), 164-179.
- Takei Y, Takahashi A, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S, Takao T, Shimonishi Y. (1990) Amino acid sequence and relative biological activity of a natriuretic peptide isolated from eel brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 170(2), 883-891.
- Takei T, Takahashi A, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S. (1991) A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles. *FEBS Lett*. 282(2), 317-320.
- Takei Y, Nemoto N, Kameya T, Tamaki H, Katsumata O, Hyodo S, Kusakabe M. (2018) Distribution and co-localization of diversified natriuretic peptides in the eel heart. *Cell Tissue Res*. 373, 367–377.
- Tarttelin EE, Bellingham J, Hankins MW, Foster RG, Lucas RJ. (2003) Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett*. 554, 410–416.
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B. (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(11), 4401-4406.

- Tsoli M, Moore M, Burg D, Painter A, Taylor R, Lockie SH, Turner N, Warren A, Cooney G, Oldfield B, Clarke S, Robertson G. 2012. Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res* 72(17):4372-4382.
- Trajanovska S, Inoue K, Takei Y, Donald JA. (2007) Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal new insights into natriuretic peptide evolution. *Peptides*. 28, 2155–2163.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-olson S, Easton A, Dalan JR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 308(5724), 1043-1045.
- Wang TJ. (2012) The natriuretic peptides and fat metabolism. *New Eng J Med*. 367(4), 377-378.
- Zhang KX, D’Souza S, Upton BA, Kernodle S, Vemaraju S, Nayak G, Gaitonde KD, Holt AL, Linne CD, Smith AN, Petts NT, Batie M, Mukherjee R, Tiwari D, Buhr ED, Gelder RNV, Gross C, Sweeney A, Sanchez-Gurmaches J, Seeley RJ, Lang RA. (2020) Violet-light suppression of thermogenesis by opsin 5 hypothalamic neurons. *Nature*. 585(7825), 420-425.
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch, JB. (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(45), 16219-16224.
- Zois NE, Bartels ED, Hunter I, Kousholt BS, Olsen LH, Goetze JP. (2014) Natriuretic peptides in cardiometabolic regulation and disease. *Nature Rev Cardiol*. 11(7), 403-412.
- Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM. (2006) Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*. 55(4), 962-970.